



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

“FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA”

**Diagnóstico de *Salmonella Typhimurium* en carne molida
utilizando dos pruebas rápidas y la técnica
de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

PMVZ Mirna Abigail Castañeda Morales

ASESORES:

Dr. Martín Talavera Rojas

Dr. Jorge Antonio Varela Guerrero

Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat



Toluca, México, Junio 2017.

**Diagnóstico de *Salmonella Typhimurium* en carne molida
utilizando dos pruebas rápidas y la técnica de reacción en
cadena de la polimerasa (PCR)**

FINANCIAMIENTO:

El presente trabajo de tesis deriva del proyecto de investigación “Implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* 0157:H7 y *Campylobacter* spp en materia prima y productos cárnicos en el valle de Toluca, México”

Financiado por la Secretaria de Investigación y Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México con la clave 3182/2012CHT

ÍNDICE.

I.-INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Producción, importación y exportación de carne en México.....	4
2.1.1 Producción de carne en México	4
2.1.2 Importación y Exportación de Carne en México	5
2.2 Enfermedades Transmitidas por alimentos.....	5
2.3 Situación de enfermedades transmitidas por alimentos en México	7
2.4 Características del género <i>Salmonella</i>	8
2.5 Esquema de KAUFFMANN-WHITE	9
2.6 Diagnóstico	10
2.6.1 Salmonelosis.....	10
2.6.2 Cuadro clínico de salmonelosis en humanos.....	11
2.6.3 Identificación del agente	12
2.6.4 Patogénesis	13
2.7 Tratamiento	14
2.8 Prevención y Control	16
2.8.1 Higiene del personal.....	18
2.8.2 Higiene ambiental del lugar donde se preparan alimentos.....	19
2.9 Epidemiología	20
2.10 Contaminación de productos cárnicos por <i>Salmonella</i>	21
2.11 Detección de <i>Salmonella</i> en alimentos	23
2.12 Aislamiento	23
2.13 Serotipificación	24

2.14 Pruebas rápidas para la identificación de <i>Salmonella</i>	24
2.15 Identificación de <i>Salmonella</i> por PCR.....	31
III. JUSTIFICACIÓN.....	33
IV. HIPOTESIS.....	35
V. OBJETIVOS	36
VI. MATERIAL.	37
VII. MÉTODO	40
VIII. LIMITE DE TIEMPO	49
IX. LÍMITE DE ESPACIO	50
X. RESULTADOS	51
XI. DISCUSIÓN.....	57
XII. CONCLUSIONES	60
XIII.SUGERENCIAS.....	61
XIV. LITERATURA REVISADA.....	62

ÍNDICE DE CUADROS.

CUADRO 1. Enfermedades transmitidas por alimentos en Humanos.....	6
CUADRO 2. Salmonella, especies, subespecies, serotipos y su habitat usual sistema de KAUFFMANN-WHITE.....	10
CUADRO 3. Principales serovariedades del genero Salmonella y hospedero que afectan.	13
CUADRO 4. Dosis de antimicrobianos utilizados en tratamiento contra Salmonella en animales.	15
CUADRO 5. Características de Algunas Vacunas Contra la Fiebre Tifoidea	16
CUADRO 6.- Pruebas rápidas para el diagnóstico de Salmonella de venta en el mercado.	29
CUADRO 7. Preparación de reactivos	41
CUADRO 8. Tabla de contingencia 2X2	48
CUADRO 9. Tabla 2X2 PCR.....	54
CUADRO 10. Tabla 2X2 BBL CRYSTAL	54
CUADRO 11. Tabla 2X2 1-2 Test	55

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

GRÁFICA 1. Análisis del tiempo de las pruebas estudiadas	55
GRÁFICA 2. Análisis de costos en las pruebas estudiadas	56

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. Producción de carne en México en el 2014 (toneladas y porcentaje).....	4
FIGURA 2. Posibles causas de enfermedades transmitidas por alimentos en humanos.....	6
FIGURA 3. Ilustración esquemática de la estrategia para la detección de <i>Salmonella</i>	42
FIGURA 4. Diagrama del 1-2 TEST.....	43
FIGURA 5. Método de uso 1-2 TEST.....	44
FIGURA 6. Incubación	45
FIGURA 7. Procedimiento de análisis BBL CRYSTAL	47
FIGURA 8. Presencia de inmunobanda positiva a <i>Salmonella</i>	51
FIGURA 9. Presencia de inmunobanda positiva a <i>Salmonella</i>	51
FIGURA 10. Ausencia de inmunobanda positiva a <i>Salmonella</i>	52
FIGURA 11. PCR detección de <i>Salmonella</i>	52
FIGURA 12. Analisis bioquímico de BBL CRYSTAL	53
FIGURA 13. Lectura de la muestra Software	53

Diagnóstico de *Salmonella Typhimurium* en carne molida utilizando dos pruebas rápidas y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Castañeda, M.M.A.; Talavera, R.M.; Varela, G.J.A, Acosta D.J.

RESUMEN

Desde los años 60's la Salmonelosis ha sido reportada como una de las principales causas de gastroenteritis tanto en animales como en humanos principalmente ancianos, recién nacidos, lactantes y personas que han sido afectadas anteriormente por otras infecciones y que provocan una inmunosupresión en estos individuos. Los principales reservorios de *Salmonella* son animales portadores asintomáticos y el origen de infección más frecuente son los alimentos de origen animal como los son embutidos, carne, leche, huevo etc., los cuales se convierten en una causa de contaminación importante al no ser manipulados con la adecuada limpieza e higiene, al igual que las verduras que son regadas con aguas negras las cuales se convierten en un foco de infección para todo individuo que consuma estos alimentos. En la mayoría de los países se ha incrementado la preocupación por asegurar el suministro de alimentos libres de peligros químicos, físicos y biológicos debido al riesgo que esto representa a la salud humana, además de ser la base para incrementar la participación de los alimentos en el comercio internacional, y contribuir para certificar la inocuidad de los productos alimenticios de importación y exportación. Entre los alimentos de origen pecuario que implican alto riesgo, se encuentran los productos cárnicos, en donde se han reportado casos de contaminación por microorganismos como *Salmonella* y *Escherichia coli* entre otros. El objetivo del presente trabajo fue determinar y comparar la sensibilidad y especificidad de tres pruebas rápidas 1-2 Test de Biocontrol Systems®, BBL Crystal Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID Kit y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ya que estos métodos son ampliamente utilizados con frecuencia dentro de laboratorios para la detección de *Salmonella*, de esta forma poder ser considerados para los estudios de frecuencia y epidemiológicos de la contaminación por *Salmonella* en carne. Tomando en cuenta que dichas pruebas rápidas acortan considerablemente los tiempos para dar un resultado, su costo accesible para el laboratorio y un manejo fácil de la prueba el cliente, puede adquirir y manipular dichas pruebas de una forma fácil. De forma contraria con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el tiempo se extiende al doble para lograr dar un resultado para la muestra analizada, es necesario equipo especializado para poder realizar esta prueba, pero también se recalca que cuenta con una ventaja, la cual es que tiene una gran sensibilidad y especificidad lo que nos permite estar seguros del resultado arrojado, siempre y cuando la prueba se haya realizado en condiciones óptimas. Los resultados observados demuestran que, la prueba rápida 1-2 Test detecto positivamente las muestras contaminadas con $10^5, 10^4, 10^2, 10^1$ UFC dando resultado negativo la muestra contaminada con 10^3 UFC, lo cual nos permite indicar que esta prueba es 80% sensible y un

80% específica ya que solo detecta como tal a *Salmonella*. Las técnicas de PCR y BBL Crystal detectaron positivamente *Salmonella* a las 5 diluciones que se estudiaron. En lo cual PCR arrojó resultados del 100% tanto en especificidad como en sensibilidad, contrario a la prueba de BBL Crystal la cual en sensibilidad obtuvo un 100% pero en especificidad un 80% ya que las muestras analizadas dieron como resultado *Salmonella spp.* y dichas muestras se inocularon con *Salmonella Typhimurium*.

PALABRAS CLAVE: *Salmonella*, Reacción en Cadena de la Polimerasa

I.-INTRODUCCIÓN.

La historia de las toxiinfecciones alimentarias (TA) se comienza a documentar y legislar en el siglo X, con el botulismo en Bizancio, y en documentos sobre el ergotismo en el siglo XVI; pero es en el siglo XX cuando se produce un desarrollo espectacular de la microbiología de los alimentos, con el establecimiento de la etiología de las TA (Leyva. *et al.*, 2008).

Más recientemente, los movimientos migratorios, la producción masiva de alimentos y la facilidad de transporte desde puntos lejanos entre la producción y el consumo, han introducido numerosas variables, lo que ha llevado a considerar a ciertos agentes de TA dentro de los llamados patógenos emergentes. Hoy en día, se devela una realidad paradójica, aunque se conocen bien los mecanismos por los que la mayoría de los patógenos alimentarios pueden producir una TA, se constata un aumento en los brotes producidos por patógenos conocidos, tales como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, entre otros (Leyva. *et al.*, 2008).

Desde los años 60's la Salmonelosis ha sido reportada como una de las principales causas de gastroenteritis (Threlfall y Fisher, 2005) tanto en animales como en humanos principalmente ancianos, recién nacidos, lactantes y personas que han sido afectadas anteriormente por otras infecciones y que provocan una inmunosupresión (Borie, 1998).

La seguridad sanitaria de los alimentos es una prioridad de salud pública universalmente reconocida que requiere un planteamiento global, en la mayoría de los países se ha incrementado la preocupación por asegurar el suministro de alimentos libres de agentes químicos, físicos y biológicos debido al riesgo que esto representa a la salud humana, además de ser la base para incrementar la participación de los alimentos en el comercio internacional, y contribuir para certificar la inocuidad de los productos alimenticios de importación y exportación. (Mercado, 2007).

Entre los alimentos de origen pecuario que implican alto riesgo, se encuentran los productos cárnicos, en donde se han reportado casos de contaminación por microorganismos como *Salmonella* y *Escherichia coli* entre otros (Threlfall y Fisher, 2005).

En la actualidad se reconoce la existencia de dos especies de *Salmonella*: *S. entérica* y *S. bongori*; a su vez *S. entérica* se subdivide en seis subespecies: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, y dentro de cada subespecie se encuentran distintos serotipos o serovares identificados en función de su respuesta serológica (Patrick. *et al.*, 2007).

Las cepas de *Salmonella* se clasifican en serotipos según la gran diversidad de los antígenos (O) del lipopolisacárido (LPS) y de los antígenos proteicos de los flagelos (H), de acuerdo con la clasificación de Kauffmann–White; en la actualidad se reconocen aproximadamente 2,600 serotipos aunque este número está en constante aumento. Los serotipos más comunes que causan infección en humanos y en animales de abasto pertenecen a la subespecie enterica. Los serotipos de las otras subespecies tienen mayor probabilidad de presentarse en animales poiquiloterms (de sangre fría) y en el ambiente, pero a veces se les asocia con la enfermedad en humanos. Algunos serotipos de las subespecies *S. arizonae* y *S. diarizonae* se han asociado con enfermedades en los pavos y en las ovejas, y otros pueden ser transmitidos por reptiles y anfibios silvestres o en cautividad. (OIE, 2008).

Para el tratamiento de las gastroenteritis ocasionadas por *Salmonella* spp se dispone de varios antimicrobianos útiles, dentro de los cuales se encuentran ampicilina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima, ceftriaxona (Threlfall y Fisher, 2005).

En los métodos tradicionales de aislamiento e identificación de *Salmonella* son necesarios una fase de pre-enriquecimiento, enriquecimiento y cultivo en medios selectivos. Para la confirmación de resultados positivos se requieren más de 7 días, por lo que es importante encontrar pruebas que acorten el tiempo de análisis con métodos más baratos que los convencionales.

Existen un gran número de métodos diagnósticos diferentes que pueden realizarse para la determinación de *Salmonella*, sin embargo, según la mayor parte de estudios realizados, el cultivo microbiológico es la prueba más comúnmente empleada para el aislamiento de la bacteria a partir de tejidos o excremento. El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y al mismo tiempo simple, rápido y económico. Ningún método cumple con todos los criterios y ninguno es óptimo para todas las condiciones, dado que pueden presentarse alteraciones en los medios de cultivo y algunas pruebas bioquímicas; por lo tanto también es aconsejable apoyarse en los nuevos métodos de diagnóstico que están innovando para el aislamiento de *Salmonella*, mediante el uso de pruebas moleculares como lo es el PCR, esta tiene la capacidad de detectar un pequeño número de organismos del genero *Salmonella* (10^2 a 10^4). Este método arroja resultados favorables y confiables en menos tiempo pero tiene la desventaja de ser costoso (Terragno *et al.*, 2003).

El método rápido oficial más usado en el mundo para detección de *Salmonella*, es el 1-2 Test es una prueba lista para usar, para detección rápida de *Salmonella*. El método 1-2 Test tiene como base la técnica de inmunodifusión en un formato listo para usar, con mejor desempeño, mayor precisión y más rapidez. Los resultados son interpretados visualmente sin uso de equipo. El 1-2 Test tiene sensibilidad y especificidad para el análisis de *Salmonella*. Utiliza una combinación de un enriquecimiento selectivo y un medio de

movilidad con anticuerpos específicos para inmovilización de *Salmonella*. Método totalmente validado, tecnología innovadora. Como método oficial AOAC. Extensivos estudios probaron la especificidad y sensibilidad del 1-2 Test. Utiliza anticuerpos específicos producidos por BioControl y que inmovilizan a las *Salmonellas* a través de la interacción antígeno-anticuerpo. El 1-2 Test está validado y aprobado para análisis en todos los productos alimenticios, ingredientes para alimentos y muestras ambientales.

Otro de los métodos rápidos utilizados en la industria es el BBL Crystal de identificación (Patógenos entéricos / No fermentantes), este sistema de identificación sirve para el reconocimiento de bacterias gram negativas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* así como también de los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores de glucosa. Los análisis utilizados en el sistema de BBL Crystal están basados en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores. Las reacciones de fermentación detectan la capacidad de un aislado para metabolizar los carbohidratos en ausencia de oxígeno atmosférico, y las reacciones de oxidación están basadas en la capacidad de un organismo para metabolizar el sustrato siendo el Oxígeno el aceptor final de electrones ambas reacciones se detectan normalmente mediante el uso de un indicador pH en el sustrato de análisis, Kits sustratos cromógenos al sufrir hidrólisis producen cambios de color que pueden ser detectados visualmente (Murray *et al.*, 1999).

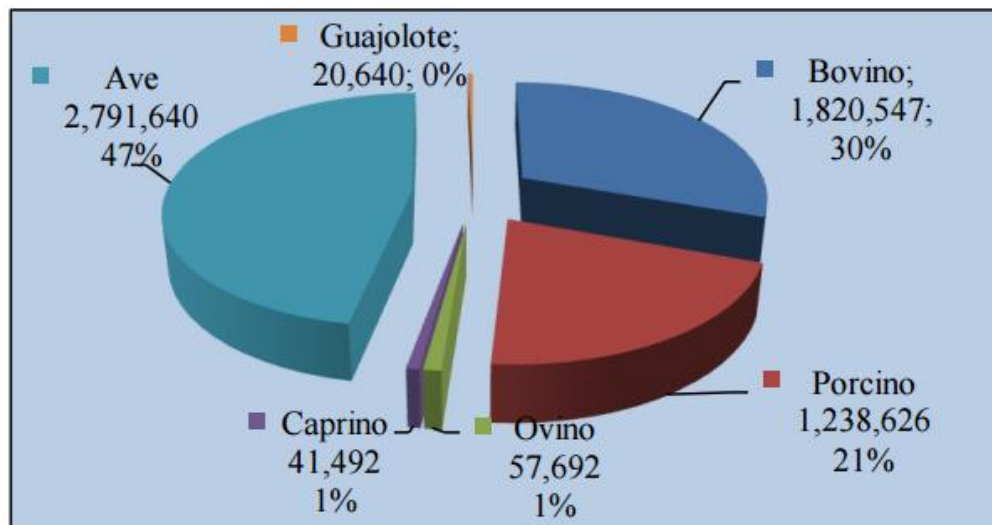
II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Producción, importación y exportación de carne en México

2.1.1 Producción de carne en México

Las tres principales especies productivas que se producen en México son pollo, bovino y cerdo. La producción nacional en el 2014 fue aproximadamente de 2.79 millones de toneladas de carne de pollo, 1.82 millones de toneladas de carne de res y por ultimo 1.23 millones de toneladas de carne de cerdo. La producción nacional de carne se muestra en la (Figura 1). Los principales estados productores de carne de pollo son: Jalisco, Durango, Veracruz, Aguascalientes y Querétaro; de carne de res son: Veracruz, Jalisco, Chiapas, Chihuahua y Sinaloa. Mientras que de cerdo son: Jalisco, Sonora, Puebla, Guanajuato y Veracruz. (SIAP, 2014).

FIGURA 1. Producción de carne en México en el 2014 (toneladas y porcentaje).



Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera, con información de las delegaciones de la SAGARPA (SIAP, 2014).

El Estado de México ocupa el décimo séptimo lugar con una producción de carne de res de 83 mil toneladas, los principales municipios productores de carne de res son: Tlatlaya, San José del Rincón y Amatepec (SIAP, 2014).

2.1.2 Importación y Exportación de Carne en México

México registró para el 2010 la mayor importación de carne de res con un volumen de 273,000 toneladas, en el año 2012 se importaron 197,000 toneladas, aumentando para el 2013 a 212,000 toneladas. La mayor parte de las importaciones provienen de Estados Unidos y Canadá, mientras que la exportación más importante fue la de 2012 con un volumen de 177,000 toneladas, en el 2013 se exportaron 144,000 toneladas (AMEG, 2014).

2.2 Enfermedades Transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos patógenos, toxinas, venenos naturales o sustancias químicas dañinas, en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (Elley, 1994).

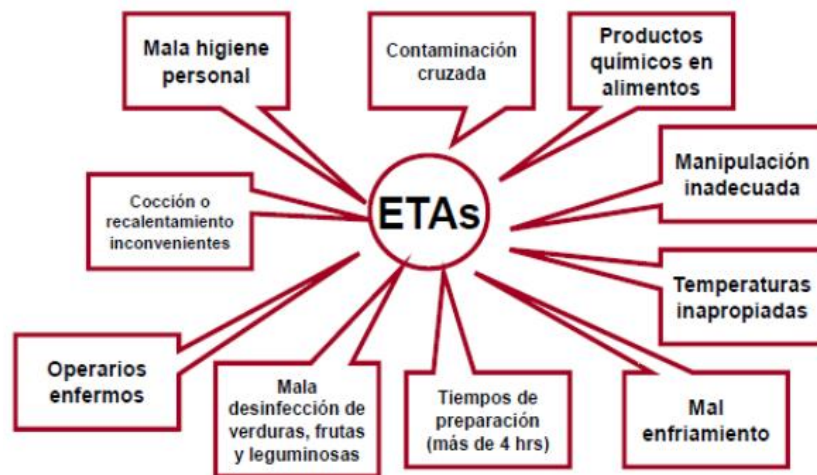
Las ETA's constituyen uno de los problemas de salud más relevantes tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. El desarrollo de nuevos productos alimenticios y nuevas tecnologías de procesamiento, el uso cada vez más difundido de sistemas centralizados de distribución rápida y el aumento del comercio internacional, representan un desafío tanto para la industria como para los organismos de control (Gurtler *et al.*, 2005).

Los cambios de hábitos y tendencia de consumo, la existencia de poblaciones especialmente susceptibles debido al envejecimiento, la desnutrición, personas inmunosuprimidas, niños, mujeres embarazadas y los cambios en las poblaciones microbianas también representan un riesgo desde el punto de vista de las ETA's (Álvarez, 2007).

Existen numerosos tipos de ETA's que presentan sintomatologías variables, dependiendo del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido. Los signos más comunes son vómitos y diarreas, pero también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble entre otros. Además ciertas ETA's pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daño renal, artritis, meningitis, abortos y en casos extremos la muerte. Las causas más comunes son intoxicaciones e infecciones (FDA, 2001; FAO/OMS, 2005).

En la Figura 2, se muestran algunas de las posibles causas que contribuyen a la aparición de ETA's.

FIGURA 2. Posibles causas de enfermedades transmitidas por alimentos en Humanos.



(Cervantes *et al.*, 2008)

Según la (FAO/WHO, 2009), dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos, las de mayor incidencia son las causadas por bacterias. Los principales agentes causales son: *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* y *Echerichia coli*, estas dos últimas se reportan principalmente en productos lácteos y cárnicos. (Cuadro 1) se muestran las características de las principales enfermedades alimentarias.

CUADRO 1. Enfermedades transmitidas por alimentos en Humanos.

BACTERIA	SÍNTOMAS	PRINCIPALES ALIMENTOS	INCUBACIÓN
<i>Salmonella</i>	Dolor abdominal, diarrea, vómito frecuente, debilidad.	Lácteos, pollo, huevo, carne, pescado.	6 a 72 hrs
<i>E. coli</i>	Dolor abdominal, vómito, diarrea sanguinolenta.	Carne molida, agua contaminada, manos sucias y moscas.	12 a 72 hrs

<i>Vibrio cholerae</i>	Diarrea abundante y acuosa, vómito, deshidratación rápida que puede causar la muerte.	Agua contaminada, alimentos en contacto con agua contaminada, manos sucias y moscas.	24 a 28 hrs
<i>Listeria monocytogenes</i>	Nauseas, vómitos, dolor de cabeza, meningitis y abortos.	Lácteos, vegetales crudos, carne de res y de cerdo mal cocida.	1 a 20 días

(Gutiérrez, 2008).

Adicionalmente, se han presentado brotes ocasionados por patógenos emergentes y reemergentes que pusieron de manifiesto la fragilidad de los programas de protección de alimentos para prevenir y controlar las ETA's. Entre los patógenos bacterianos emergentes se destacan: *Salmonella enteritidis* en huevo, *Salmonella typhimurium* en alimentos de origen animal (Poppe, 1998), *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC) en carnes y vegetales (Masena, 2010), *Listeria monocytogenes* en carne y quesos (Copes *et al.*, 2000), *Campylobacter jejuni* y *Yersenia enterocolitica* en carne de cerdo y aves (López, 2000).

Entre los reemergentes se encuentra *Vibrio cholerae* O1, cuya principal fuente de infección es el agua y los alimentos de origen marino (González *et al.*, 2009).

Las ETA's no solo afectan de manera significativa la salud y el bienestar de las poblaciones, sino también imponen una carga sustancial en los sistemas de salud y reducen notablemente la productividad económica del país. Los costos originados por estas enfermedades humanas son elevados. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, estima que 76 millones de personas por año sufren de ETA's en ese país 325,000 personas son hospitalizadas y 5,000 mueren, por lo tanto las ETA's tienen un importante impacto económico y expertos en salud estiman que sólo en Estados Unidos el costo anual de todas las ETA's es de 5 a 6 billones de dólares (CDC, 2007).

2.3 Situación de enfermedades transmitidas por alimentos en México

Las enfermedades transmitidas por alimentos son una de las principales causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Por ello, se les considera un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta a personas de

cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos (León-Ramírez, 2002).

En México no se tienen registros concretos de la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos y de los agentes causales debido a que en la mayoría de los casos (diarreas, náuseas, vómitos, etc.) no son atendidos en clínicas u hospitales y son controlados en el hogar (Hernández *et al.*, 2011). Los agentes patógenos involucrados son virus, bacterias y parásitos. La búsqueda e identificación de estos, en los laboratorios clínicos, se centra principalmente en patógenos clásicos como: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Yersinia*. Existen otros géneros involucrados en estas enfermedades, como *Aeromonas*, que en otros países se ha documentado como agente etiológico de enfermedades gastrointestinales y marcador de contaminación fecal en el agua (Vidal *et al.*, 2007).

Las bacterias del género *Salmonella* causan la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas y, aunque puede ser causada por cualquiera de los 2,500 serotipos que existen hasta hoy, existe la susceptibilidad por especies, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son *Salmonella enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* (Gutiérrez *et al.*, 2000).

En México el organismo encargado de llevar los registros por brotes de estas enfermedades es el CENAVECE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades); según reportes de este centro, en el 2012 se presentaron 127,756 casos de paratifoidea y otras salmonelosis y 53,737 de fiebre tifoidea así como 5,279,236 casos por infecciones intestinales causadas por diferentes organismos. Para el 2013 se presentaron 30,387 casos de paratifoidea y otras salmonelosis y 18,701 casos de fiebre tifoidea, así como 2,014,580 casos por infecciones intestinales causadas por diferentes organismos (CENAVECE, 2013).

2.4 Características del género *Salmonella*

Los microorganismos del género *Salmonella* están extensamente diseminados en la naturaleza como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos, en los cuales pueden llegar a producir una amplia gama de enfermedades (Smith y Ahmer, 2003). Todas las salmonelas son potencialmente patógenas (Mahajan *et al.*, 2003) al ser parásitos intracelulares y por medio de los macrófagos en los que se encuentran, se diseminan por todo el organismo afectado aprovechando la vía linfática y sanguínea (Stanchi, 2007).

Las diversas especies de esta bacteria se transmiten por contacto tanto con enfermos como con portadores sanos, aunque por lo general la enfermedad producida por este agente

microbiano tiene un origen alimentario debido a la ingesta de comestibles contaminados con el patógeno, teniendo en cuenta que la fuente de contaminación ambiental es invariablemente la materia fecal (Stanchi, 2007).

Morfológicamente, los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram negativos, 0.7-1.5 x 2.0-5.0 µm, generalmente no fermentan lactosa, aerobio facultativo, no esporulado, generalmente móviles por flagelos peritricos (Jawetz *et al.*, 2005). Poseen metabolismo fermentativo y oxidativo; fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S.Typhimurium*), también fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa y D-dulcitol, son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer negativo, rojo de metilo y citrato positivo, producen H₂S, son urea negativo y descarboxilasa positivo (Terragno *et al.*, 2003). Otras características bioquímicas son la reducción de los nitratos a nitritos (Jawetz *et al.*, 2005).

El género *Salmonella*, definido por su conjunto de características bioquímicas, reúne cerca de 2,500 tipos serológicos; cada tipo serológico a su vez está caracterizado por antígenos específicos que pueden ser identificados mediante pruebas serológicas. Los antígenos que caracterizan los tipos serológicos de las salmonellas son los antígenos O (somáticos), y los antígenos H (flagelares); algunos presentan el antígeno denominado Vi. Existen tres tipos de *Salmonella*, la *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella enteritidis* (White *et al.*, 2008).

2.5 Esquema de KAUFFMANN-WHITE

La identificación de los serotipos sobre la combinación antigénica está dada en el esquema de Kauffmann-White, publicado por el centro colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de Referencia e Investigación de *Salmonella* del Instituto Pasteur en París el cual agrupa todas las serovariedades de *Salmonella* sp. conocidas. Ambos investigadores diseñaron su clasificación considerando ciertas determinantes antigénicas presentes en el Ag O que determinan la existencia de grupos o serogrupos de la A a la I y a los antígenos flagelares en fase 1 que hoy en día establecen el serotipo (Bonne, 2001).

Este esquema plantea las diferencias mediante la identificación de los antígenos de superficie que se producen en la bacteria. La especificidad del factor “O” (somático) de *Salmonella* sp. se determinan por la composición y la estructura de la cadena polisacárida O del lipopolisacárido. Al antígeno O, se lo designan con números; *Salmonella* sp. se clasifica en serogrupos que surgen del antígeno somático O; a estos grupos se los designa con letras mayúsculas, por ejemplo, A, B, C₁, C₂, D₁, D₂, E₁, E₂, etc, (Bonne, 2001).

El antígeno flagelar representado por letras minúsculas y números, caracteriza a los serotipos dentro de cada grupo, rara vez se hace referencia al antígeno Vi que es asociado a la cápsula bacteriana.

CUADRO 2. *Salmonella*, especies, subespecies, serotipos y su habitat usual sistema de KAUFFMANN-WHITE.

Especie y subespecie de <i>Salmonella</i>	No. de serotipos dentro de la especie
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1531
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>S. bongori</i> (V)	22
Total	2579

(Bonne, 2001).

2.6 Diagnóstico

2.6.1 Salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del hombre y los animales causada por microorganismos de dos especies de *Salmonella* (*Salmonella enterica* y *S. bongori*). Aunque fundamentalmente son bacterias intestinales, *Salmonella* está distribuida en el ambiente y se encuentran con frecuencia en desechos de granjas, aguas residuales y en cualquier material contaminado con heces. En el hombre, el género *Salmonella* es uno de los agentes etiológicos de infecciones intestinales y sistémicas, por lo general, como contaminantes primarios de los alimentos de origen animal, vegetales y ambiental o frecuentemente como consecuencia de la infección subclínica en animales de abasto que provoca la contaminación de la carne, huevo y leche o la contaminación secundaria de frutas y verduras que se han fertilizado o regado con desechos orgánicos como lo son las aguas negras (OIE, 2008).

Salmonella es un bacilo Gram negativo, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, no esporulado, es termolábil, puede ser destruida fácilmente con temperaturas de pasteurización (Leyva *et al.*, 2008).

Salmonelosis puede afectar a todas las especies de animales domésticos; los más susceptibles son los animales jóvenes. La manifestación más común de la enfermedad es la entérica, pero se puede observar un espectro muy amplio de síntomas clínicos que incluye septicemia aguda, aborto, artritis y enfermedad respiratoria. Muchos animales, en especial los cerdos y las aves, pueden estar infectados sin manifestar la enfermedad clínica. Tales

animales pueden ser importantes en la difusión de la enfermedad entre explotaciones y como fuentes de contaminación alimentaria y de infección humana (OIE, 2008).

Los principales reservorios de *Salmonella spp.* son animales portadores asintomáticos y las fuentes de infección más frecuente son los alimentos o los productos derivados de ellos, lo cual tiene un gran impacto en salud pública como en salud animal (Uribe y Suárez, 2006).

2.6.2 Cuadro clínico de salmonelosis en humanos

Los síntomas aparecen generalmente de 6 a 48 horas después del consumo de agua o alimentos contaminados. El cuadro clínico de la salmonelosis no tífica (gastroenteritis o enterocolitis) puede incluir diarrea, cefalea, dolor abdominal, náusea, vómito, fiebre y deshidratación. Afecta a todos los grupos de edad, con mayor incidencia en menores de cinco años y mayores de 60 años de edad, que son los grupos más vulnerables. Las defunciones por esta causa son raras; sin embargo, la morbilidad y los costos de la infección por *Salmonella* suelen ser altos (Uribe y Suárez, 2006).

La diarrea por *Salmonella spp.*, puede variar en volumen e intensidad. En la mayoría de los casos las heces blandas son de volumen moderado y no contienen sangre ni moco. Las deposiciones de los pacientes con gastroenteritis suelen tener leucocitos polimorfonucleares neutrófilos como consecuencia de un proceso inflamatorio o invasivo, en el colon o en el intestino delgado distal; es común observar fiebre entre 38°C y 39°C y cólicos abdominales. El período de transmisibilidad dura todo el tiempo durante la evolución de la enfermedad, que es muy variable, generalmente de varios días a algunas semanas. Según las serovariedades implicadas, 1% de los adultos infectados y alrededor del 5% de los niños menores de 5 años de edad puede excretar el microorganismo por más de un año.

Después de que se soluciona la gastroenteritis, la presencia de *Salmonella spp.*, en heces es de 4 a 5 semanas aunque puede variar de acuerdo con la serovariedad. El estado portador en el caso de personas infectadas con *S. Typhi* se debe a la persistencia del microorganismo en la vesícula biliar y puede presentarse entre 3% y 5% de los individuos comprometidos. La infección puede ser asintomática y permanecer por varios años. Aproximadamente 5% de las personas con gastroenteritis debida a *Salmonella* no tífica pueden desarrollar bacteriemia y problemas serios y potencialmente mortales, aunque la bacteriemia y la presentación de infecciones locales son más comunes en pacientes inmunocomprometidos (Uribe y Suárez, 2006).

En los adultos la bacteriemia debida a serovariedades no tíficas de *Salmonella spp.*, son más grave, aunque sólo representa un pequeño porcentaje de las personas con infección clínica y subclínica, una complicación grave es el desarrollo de arteritis infecciosa, sobre todo si esto implica la aorta abdominal. En los niños, las infecciones debidas a este

microorganismo incluyen meningitis, artritis séptica, osteomielitis, colangitis y neumonía. Las serovariedades no tíficas de *Salmonella* también con frecuencia se aíslan de pacientes con infecciones urinarias (Uribe y Suárez, 2006).

El aislamiento de *S. no typhi* en la orina es un hallazgo inusual que se produce tras la colonización de la uretra o por diseminación hematógena a partir del tracto gastrointestinal. Se ha descrito con mayor frecuencia en enfermos con inmunosupresión, neoplasias, litiasis y anomalías estructurales del tracto genitourinario (Leyva *et al.*, 2008).

2.6.3 Identificación del agente

La vigilancia de *Salmonella* en la cadena productiva y el procesamiento de alimentos constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de este patógeno. El mercado nacional e internacional, para proteger la salud de los consumidores, exige que todos los alimentos estén libres de enteropatógenos y *Salmonella*. (Galvez, 2006).

Se han hecho grandes esfuerzos en materia de prevención para el control de las enfermedades transmitidas por alimentos por parte de las industrias y de las entidades encargadas del control. Muchos países, tienen establecido dentro de su legislación “cero tolerancia” para *Salmonella* (Leyva *et al.*, 2008) y los métodos para su identificación son variados.

En México, las técnicas microbiológicas para la identificación de *Salmonella* que actualmente se usan en laboratorios acreditados o autorizados tardan de 5 a 10 días para determinar la presencia o ausencia del microorganismo en los alimentos analizados (Estrada *et al.*, 2004). Estas técnicas, basadas en el uso de medios de cultivos, consisten principalmente en el pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios de cultivo, identificación bioquímica y la identificación serológica, con la que concluye la identificación específica del patógeno (NOM-114-SSA1-1994).

Los métodos moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han demostrado alta sensibilidad y especificidad para la detección de patógenos, incluyendo *Salmonella* en diferentes tipos de alimentos y el tiempo requerido para obtener resultados pueden ser tan cortos como 24 horas (Leyva *et al.*, 2008).

Los miembros del género *Salmonella* (cuadro 3) están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio proceso de enfermedades en el hombre y los animales (Glenn y Karen, 2005).

CUADRO 3. Principales serovariedades del genero *Salmonella* y hospedero que afectan.

SEROVARIEDADES	HOSPEDEROS
typhi	Humanos
pullorum	Aves
choleraesuis	Cerdos
abortusovis	Ovinos
dublin	Becerras

(Glenn y Karen, 2005).

2.6.4 Patogénesis

La puerta de entrada es la vía digestiva. El bacilo debe sobrepasar la barrera defensiva representada por la acidez gástrica. El agente que consigue sobrevivir las primeras 24 a 72 horas en el intestino, penetra el epitelio donde se multiplica y produce alteraciones histopatológicas. En el caso de la fiebre tifoidea los bacilos buscan un hábitat intracelular, lo que corresponde a la llamada fase mesentérica en la cual los gérmenes penetran a los ganglios y continúan multiplicándose para posteriormente pasar a la circulación sanguínea y a las placas de Peyer, tejido linfoide del intestino (Borie, 1998).

El mecanismo de producción de la diarrea, está relacionado más directamente con las de tipo secretorio, en el que la respuesta inflamatoria, debida a la penetración de la *Salmonella* produce liberación de prostaglandinas como por ejemplo *Salmonella abortus ovis*, que a su vez estimulan la producción de AMP cíclico y como consecuencia, secreción activa de líquidos (Borie, 1998). Las Salmonelas tíficas y paratíficas normalmente invaden la circulación, mientras que las otras están limitadas a la mucosa intestinal. Algunas como la *S. dublin* son sistémicas (Flores *et al.*, 1997).

La fiebre tifoidea producida por la *S. typhimurium* es una enfermedad exclusiva del hombre, el no ser posible reproducirla en ninguna otra especie animal, hace difíciles los estudios experimentales sobre su patogenia; los datos conocidos correspondientes a estudios realizados en voluntarios humanos (Flores *et al.*, 1997).

Muchas de las manifestaciones de la fiebre tifoidea son causadas por los metabolitos del ácido araquidónico, los radicales libres de oxígeno y otros mediadores liberados por las

células mononucleares y los macrófagos (Flores *et al.*, 1997). Los factores de patogenicidad de la *Salmonella* son: Lipopolisacáridos, flagelos y fimbrias (Threlfall y Fisher, 2005).

Las *Salmonellas* son bacterias invasoras y enterotoxigénas. La infección se localiza principalmente en el íleon terminal y en el intestino grueso (Threlfall, 2000). Las bacterias son capaces de sobrevivir fuera del cuerpo durante largos periodos y en los alimentos cálidos y húmedos se multiplican rápidamente (Glenn y Karen, 2005). Dadas las variadas manifestaciones clínicas de la salmonelosis, la confirmación del diagnóstico de estas infecciones, requiere del aislamiento del agente y la identificación del mismo. (Glenn y Karen, 2005). En el caso de las gastroenteritis causadas por *Salmonella* spp. se colectan muestras de heces o en caso de enfermedades sistémicas causadas por estas bacterias se envían muestras de sangre para realizar cultivo estándar de sangre (Terragno *et al.*, 2001).

2.7 Tratamiento

Para la selección de los antimicrobianos a usar en el tratamiento contra *Salmonella* se debe tomar en cuenta las siguientes consideraciones: eficacia clínica, prevalencia de resistencia, costos, indicaciones de la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos), entre los antibióticos con efectividad para *Salmonella typhimurium* (Painter *et al.*, 2013). Se encuentran:

- Aminopenicilinas (ampicilina)
- Cloranfenicol (solo para aislamientos de infección sistémica)
- Tetraciclina
- Trimetoprim / Sulfametoxazol
- Fosfomicina
- Nitrofuranos
- Quinolonas (ciprofloxacina o norfloxacina)

Para el tratamiento ambulatorio y hospitalario de niños y adultos con fiebre tifoidea (casos aislados, casos fuera de brote epidémico o cuando el germen sea sensible con base al patrón de susceptibilidad de *S. typhi*) se recomiendan los siguientes antimicrobianos como fármacos de primera línea:

1. Ciprofloxacina: Niños: 15 a 20 mg/Kg/día VO c/12 h por 7 días Adultos: 500 mg VO c/12 h por 7 días.

2. Cefixima: Niños: 15 a 20 mg/Kg/día VO c/12 h por 14 días Adultos: 200 mg VO c/12 h por 14 días.

3. Cloranfenicol: Niños: 50 a 75 mg/kg/día VO c/6 h por 14 días (no exceder 3 g) Adultos: 500 mg VO c/6 h por 14 días (no exceder 3 g).

Cuando no es posible utilizar los fármacos de primera línea las alternativas son:

1. Ampicilina: Niños: 50 a 100 mg/Kg/día VO c/6 h por 14 días Adultos: 1gr VO cada 6hs

2. Amoxicilina: Niños: 50 a 100 mg/Kg/día VO c/6 h por 14 días Adultos: 1gr VO cada 8hs

3. Trimetoprim Trimetoprim –sulfametoxazol: sulfametoxazol: Niños: 4 a 10 mg/Kg/día (en base a trimetoprim) VO c/12 h por 14 días Adultos: 160 mg (en base a trimetoprim) VO c/12 h por 14 días

El tratamiento para combatir salmonelosis en animales al igual que en humanos es variado como lo podemos observar en el Cuadro 4.

CUADRO 4. Dosis de antimicrobianos utilizados en tratamiento contra *Salmonella* en animales.

MEDICAMENTO	ESPECIE	DOSIS
PENICILINA PROCAINA OLEOSA G	Caninos, Felinos, Bovinos, Ovinos y Caprinos	Presentación de 100mL (30 millones) y 250mL (75 millones) / 1mL por cada 20 kg. / IM. Presentación de 20mL (4 millones) / 1.5mL por cada 20 kg. / IM.
		10 mg por kg de peso equivalente a 1mL por cada 25 kg. / IM, IV, SC.
AMPICILINA INYECTABLE	Caninos, Felinos, Bovinos, Ovinos y Caprinos	En presentación de 250 mg, 1mL por cada 10 kg. / IM, IV, SC.
GENTAMICINA	Caninos, Felinos, Bovinos, Ovinos y Caprinos	1mL por cada 25 kg. / IM, IV, SC, O, IMM.

SULFA TRIMETOPRIM	Caninos, Felinos, Bovinos, 3mL por cada 50 kg. / IM, Ovinos y Caprinos IV, SC.
--------------------------	---

(REFERVET, 2010)

2.8 Prevención y Control

Dentro de la prevención contra *Salmonella*, encontramos la aplicación de algunas vacunas en humanos, las cuales solo están disponibles en algunos países.

CUADRO 5. Características de Algunas Vacunas Contra la Fiebre Tifoidea

	Vacuna Ty21a	Vacuna de polisacárido Vi
Descripción	Cepa atenuada de <i>S. ando</i>	Obtenida del antígeno polisacárido capsular purificado de <i>S Typhi</i>
Vía de administración y dosis	Vacuna oral disponible en cápsulas de cubierta entérica. Se administra en cuatro dosis, una cápsula vía oral en días alternos con un intervalo de 48hs entre cada dosis	Se administra en una dosis parenteral única intramuscular o subcutánea de 0.5ml
Revacunación	Los viajeros deben revacunarse anualmente, y quienes viven en regiones endémicas deberán hacerlo cada tres años	Se recomienda una revacunación cada tres años
Protección	Confiere protección después de diez a 14 días posteriores a la tercera dosis	La protección empieza siete días después de la inyección, la protección máxima se alcanza el día 28 después de la inyección
Edad	Aprobado su uso en niños a partir de los cinco años de edad	Aprobada para las personas de más de dos años de edad
Reacciones adversas	Fiebre y dolor de cabeza en el 0 al 5% de los casos	Fiebre 0 a 1% de los casos, dolor de cabeza 16 a 20%, eritema o induración de 1cm en 7% de casos
Observaciones	Esta vacuna está autorizada en 56 países de África, Asia, Europa, América del Sur y los EE.UU. (WHO 2003)). Un problema teórico asociado con la vacuna Ty21a es si la vacuna vuelve al estado anterior de virulencia; sin embargo, tales efectos hipotéticos no han sido documentados en ninguno de los múltiples y amplios ensayos realizados	Esta vacuna está autorizada en Australia y en más de 92 países de África, América, Asia y Europa (WHO 2003))

(Fraser *et al.*, 2008).

Se utilizan muchas vacunas inactivadas contra la salmonelosis causada por serotipos diferentes en varias especies animales, incluyendo una vacuna combinada contra *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* para empleo en aves. La inactivación se realiza normalmente por calentamiento o por tratamiento con formalina y se suele utilizar un adyuvante, como el hidróxido aluminico. En varios países también se han utilizado vacunas vivas; estas

incluyen las cepas semi-rugosas, tales como la 9R para la tifosis aviar y la HWS51 para las infecciones por *S. dublin*. Otras vacunas atenuadas incluyen mutantes autotróficos y “de deriva metabólica”, que se usan en Alemania para evitar infecciones por *Salmonella* en animales de granja y en el Reino Unido para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en aves de corral. Se han desarrollado vacunas mutantes, atenuadas racionalmente por supresión de genes mediante técnicas de biología molecular, para aves de corral y para otras especies; estas comprenden los mutantes *aroA* y las cepas con mutaciones en los genes que codifican la adenilato ciclasa (*cya*) y la proteína receptora del adenosín monofosfato cíclico (*crp*), disponibles en los EE.UU. Normalmente, en Europa no se permite el uso como vacunas de microorganismos genéticamente modificados (Mastroeni *et al.*, 2001).

Las enfermedades transmitidas por alimentos, o mejor conocidas como ETA's, son enfermedades que afectan la salud de las personas, y que se transmiten principalmente por alimentos que han sido contaminados desde su origen, durante su preparación o después de este proceso (OMS, 2007).

Por esto existen medidas que nos permiten realizar los procedimientos de preparación de alimentos de la mejor manera, con la finalidad de proporcionar al consumidor un alimento seguro y sin ningún riesgo de enfermedad (OMS, 2007).

a) Lavado y Desinfección de los Alimentos.

La mejor manera de prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos es comenzando con un adecuado lavado y desinfectado, especialmente de los que serán consumidos crudos como las frutas y verduras, este procedimiento permite eliminar de la superficie de los alimentos la carga microbiana que a simple vista no se identifican (Secretaria de Salud, 2001, 2013).

Existen varios tipos de cocción para los alimentos cada uno adecuado para el tipo de resultado que se quiera obtener, entre los principales tenemos: el asado, horneado, freído, cocción directa y al vapor. Las temperaturas recomendadas para una adecuada cocción de los alimentos son:

Cerdo y carne molida a 69 °C durante 15 minutos mínimo.

Aves o carnes rellenas a 74 °C durante 15 minutos mínimo.

El resto de los alimentos arriba de 63 °C durante 15 minutos mínimo (Secretaria de Salud, 2001, 2013).

b) Manipulación de Alimentos

Los alimentos preparados deben utilizarse inmediatamente, no pueden estar por más de dos horas a temperatura ambiente, emplear utensilios que reduzcan el contacto directo de los alimentos con las manos. No se debe poner en contacto a los alimentos crudos con los ya cocidos. Evitar guardar restos de alimentos, en caso de ser necesario, utilizar recipientes limpios y con tapadera. No probar los alimentos con los dedos. Lavar las tapaderas de los alimentos enlatados antes de ser abiertos. En la medida que sea posible no utilizar trapos o franelas en la cocina (Secretaría de Salud, 2012).

c) Prevención y control de *Salmonella* en animales

- Mantener un único origen para la repoblación y disponer de cuarentena en caso de introducirla de una fuente exterior. Sería recomendable que el origen siguiera un programa de control de prevalencias de la enfermedad.
- Mantener un correcto control de roedores, insectos y pájaros.
- Disponer de unas correctas medidas de bioseguridad pasivas: vallado externo completo de la explotación que evite la entrada de personas y animales; muelle de carga que permita evitar el contacto directo de la explotación con la caja del camión y que prevenga la reentrada de líquidos y animales; vestuario para visitas; correcta delimitación de zona sucia y limpia; descarga de pienso y materiales desde el exterior; recogida de cadáveres desde zona sucia; etc.
- Evitar la entrada de otros animales domésticos en las naves.
- Control de visitas. Obligatoriedad de cambio de calzado y vestuario, así como exigencia de lavado y desinfección de manos.
- Origen seguro del pienso y correcta conservación.
- Desinfección del agua de bebida y correcta distribución. (Terragno *et al.*, 2003).

2.8.1 Higiene del personal

El personal encargado de preparar los alimentos es en gran parte uno de los vectores que en ocasiones puede ser el responsable de la transmisión de enfermedades, ya que estos pueden presentarse a trabajar estando enfermos o siendo portadores de enfermedades como en este caso la salmonelosis y al no realizar adecuadamente el lavado de manos la persona enferma podría contaminar los alimentos que esté manipulando. Es por eso que se deben contar con reglas básicas para la adecuada higiene del personal que tenga contacto con los productos alimenticios. (Secretaría de Salud, 2012).

Las reglas básicas de higiene para los involucrados en la manipulación de alimentos son las siguientes:

- Deberán lavarse las manos diariamente, antes de empezar con sus labores
- Mantener el cabello y boca cubiertos
- Presentarse con ropa y calzado limpios
- No utilizar, reloj, anillos, aretes, pulseras o cualquier tipo de joyas
- Presentarse con las uñas limpias, bien recortadas y sin esmalte
- Abstenerse de toser, estornudar o hablar sobre los alimentos.
- No fumar, comer, masticar chicle o beber en el área o durante la preparación de los alimentos.
- Evitar tocarse el pelo, cara, orejas o cualquier parte del cuerpo mientras manipule alimentos.

2.8.2 Higiene ambiental del lugar donde se preparan alimentos

El lugar en donde se prepararán los alimentos debe estar ubicado lejos de aguas estancadas, tiraderos de basura, letrinas o cualquier fuente contaminación, además de:

- Estar en las mejores condiciones posibles para facilitar las operaciones de limpieza; deberá contar con techo, paredes y piso lisos limpios y libres de agujeros.
- Se debe limpiar el terreno circundante de arbustos, matorrales o cualquier cosa que permita el alojamiento de animales.

El proceso de limpieza que se debe seguir es el siguiente:

- Se debe lavar todo el equipo, utensilios y mesas de trabajo que hayan sido utilizados siempre después de cada comida.
- Utilizar jabón o detergente, estropajo y agua limpia para lavar el material y el equipo.
- Eliminar perfectamente bien los restos de comida de las superficies.
- Enjuagar con agua limpia y dejar secar en escurridores o utilizando una toalla limpia o cualquier material absorbente que sea de preferencia desechable (Secretaría de Salud, 2012).

2.9 Epidemiología

Salmonella, en el ámbito mundial, está asociada con mucha frecuencia a las enfermedades diarreicas, las cuales continúan siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad sobre todo en lactantes, niños y ancianos. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica, dependiendo de factores socioeconómicos y nutricionales, la probabilidad de que un niño muera por enfermedad diarreica antes de los 7 años pueda llegar al 50% (Mead y Steen, 1999).

En los Estados Unidos de América y el Reino Unido, se calcula que al año ocurren 1'412,498 casos de *Salmonella* y 73,193 infecciones de *Salmonella no Typhi*, y se estima que este patógeno es responsable de aproximadamente 30% de las muertes relacionadas a infecciones transmitidas por alimentos. La comunidad científica y las autoridades sanitarias asumen que, en general, las aves, cerdos y bovinos son los reservorios más frecuentes de *Salmonella* y que la ingestión de alimento directa o indirectamente contaminado es la causa más común de las infecciones en el humano (Ricon, *et al.*, 2011).

Por las dificultades técnicas y logísticas, existen pocos estudios sobre la transmisión de este patógeno a lo largo de toda la cadena alimenticia y las condiciones necesarias para producir enfermedad en un hospedero humano. Por ende, la legislación referente a inocuidad alimentaria establece medidas de control o límites de tolerancia basados en información epidemiológica obtenida de estudios transversales realizados en las naciones industrializadas (Ricon, *et al.*, 2011).

En muchas ocasiones esta información no puede ser extrapolada al panorama de los países en desarrollo. En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*. Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. La falta de un sistema de vigilancia y la comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, para la realización de dichos estudios son los responsables de que no se pueda brindar un panorama general de los daños causados por esta bacteria (Ricon, *et al.*, 2011).

Tan solo en el 2008, se reportaron 1,034 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Estos brotes causaron más de 23,152 casos de enfermedades y 22 muertes. En casi la mitad de los brotes las pruebas de laboratorio detectaron una causa única; la más común fue el norovirus, y representó casi la mitad de los brotes y las enfermedades. *Salmonella* fue la segunda causa más común, detectada en 23% de los brotes y el 31% de las enfermedades. Las mayores causas de los brotes fueron aves (15%), carne de res (14%) y pescados (14%) (Ricon, *et al.*, 2011).

Más de 1,200 personas fueron hospitalizadas debido a brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en el 2008. Esto equivale al 6% de todas las personas que se enfermaron por los brotes (un alto porcentaje si se compara con el promedio de 4% notificado entre el 2003 y el 2007). Es más, este fue el mayor número de hospitalizaciones relacionadas con enfermedades transmitidas por los alimentos reportados desde que se puso en marcha el sistema de vigilancia de brotes en 1973. Las principales causas de hospitalización fueron:

- *Salmonella* (62%)
- *E. coli* productora de la toxina Shiga (17%)
- Norovirus (7%)

El noventa por ciento de las enfermedades causadas por brotes de botulismo llevaron a hospitalización lo mismo que el 76% de las enfermedades relacionadas con brotes de listeria. 22 muertes se atribuyeron a enfermedades transmitidas por los alimentos. *Salmonella* fue responsable de la mayoría de muertes seguida por *Listeria* y *E. coli*. (Enfermedades, 2008).

2.10 Contaminación de productos cárnicos por *Salmonella*

La existencia de *Salmonella* en poblaciones animales se debe a la contaminación de los alimentos, por los animales de la misma población que son portadores de estos microorganismos o que están infectados. Un portador asintomático se define como un animal o una persona que elimina dicha enfermedad, sin presentar síntoma de la infección (Ukuku y Fett, 2006).

Las aves son afectadas especialmente por esta enfermedad, aunque también el cerdo y el ganado vacuno están sujetos a infecciones de esta clase. Por otra parte puede haber salmonelas en los huevos enteros, así como en el contenido intestinal de muchos animales de sangre caliente.

Existen casos en que, estos microorganismos están presentes en la carne de los animales, pero indudablemente raro. Cuando se encuentran en carne de pollo lo más probable es que las superficies cárnicas se contaminarán, directa o indirectamente con el contenido intestinal (Stocki *et al.*, 2007).

Se ha investigado la presencia de *Salmonella* en granjas de porcinos y bovinos, así como en rastros y se comprobó que en corrales de animales infectados, cuando llegaban a la sala de matanza, una parte significativa de estos (12% al 18%), se encontraban infectados. Se sabe que una pequeña proporción de porcinos y bovinos se infecta de *Salmonella* antes de su comercialización y que algunas aves tienen ocasionalmente esta enfermedad, por lo que el problema pudiera tener origen en la granja (Steenackers *et al.*, 2012). La contaminación de

animales con *Salmonella* en el rastro, proviene desde el suministro de alimentos en la granja, las prácticas de transporte y aquellas previas al sacrificio de los animales.

Aspectos como la preparación de los animales para el sacrificio, el método de insensibilización, las técnicas de sacrificio, sangrado, eviscerado y manejo de la canal están directamente relacionadas con la inocuidad de la carne, por lo cual debe prestarse especial importancia a los programas de limpieza y desinfección de las instalaciones propias de un rastro, para minimizar los riesgos que afectan la calidad y la contaminación de la carne (FAO, 2007). Además esto se complementa con estudios de contaminación de la carne y la canal, incluyendo los parámetros de inocuidad y los métodos de su determinación en la línea de sacrificio, así como los temas importantes en la actualidad, como la implantación del sistema HACCP (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, por sus siglas en inglés) en rastros y la trazabilidad de la carne (Miranda *et al.*, 2010).

Las carnes frescas se pueden contaminar de *Salmonella* a través de los operarios de los rastros o como consecuencia de mal manejo de los animales portadores; esta situación se vuelve más frecuente cuando la carne de cerdo, pollo y res pierden la cadena de frío y se mantienen a temperatura ambiente en el proceso de comercialización, permitiendo así la multiplicación bacteriana (FAO/WHO, 2009).

De acuerdo con un reporte de la EFSA-ECDC (2011), en la Unión Europea, la salmonelosis fue la infección zoonótica de segundo orden en 2009 con 108,614 casos confirmados en humanos y una tasa de mortalidad de 0.08%, la cual correspondió a 90 personas fallecidas. Ese año *Salmonella* fue el patógeno más común en carne fresca de pollo, pavo y cerdo. Los dos serotipos de *Salmonella*, implicados en la mayoría de los casos fueron *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella enteritidis* (52.3% y 23.3%, respectivamente) (Scallan *et al.*, 2011).

En 2012, cerca del 40% de las infecciones bacterianas y parasitarias confirmadas por laboratorio en las zonas de vigilancia de la FoodNet fueron debidas a *Salmonella* (CDC, 2007). Una amplia variedad de productos alimenticios han sido implicados en brotes de *Salmonella*, como la carne de res, aves, huevo, productos lácteos, mantequilla de maní (CDC, 2013).

En México existen muchas variantes en las condiciones sanitarias de los tipos de carne que se comercializan, estas condiciones son dependientes del desarrollo económico de la industria en las diversas regiones geográficas del país. La nula condición de higiene en el manejo de la carne que se vende en los mercados, constituye un riesgo a la población consumidora (Rubio *et al.*, 2013). Las consecuencias en salud pública por contaminación con *Salmonella* en carne para consumo humano, es motivo central de varios estudios, lo que obligó a abordar algunos factores clave en origen y reproducción de *Salmonella* en el

proceso de distribución de la carne, para consumo humano (Gutiérrez *et al.*, 2000; Estrada *et al.*, 2004; Gallegos *et al.*, 2009).

El riesgo para la salud de los consumidores que adquieren productos cárnicos está latente en México, así lo demostraron los resultados de una investigación realizada por (Rubio *et al.* 2013), quienes al analizar muestras de carne de bovino, procedentes del extranjero y mexicanas, encontraron el 27.78% de muestras positivas a *L. monocytogenes*, 8.89% a *Salmonella* y 28.89% a *Y. enterocolitica*. Las muestras mexicanas presentaron mayor índice de contaminación con estas bacterias que las muestras de carne importada (CDC, 2013).

2.11 Detección de *Salmonella* en alimentos

La vigilancia de *Salmonella* en la cadena productiva y el procesamiento de alimentos constituyen un elemento importante en la investigación de la epidemiología de este patógeno. El mercado nacional e internacional, para proteger la salud de los consumidores, exige que todos los alimentos estén libres de Enteropatógenos y *Salmonella* (Gálvez, 2006).

Se han hecho grandes esfuerzos en materia de prevención y control de las enfermedades transmitidas por alimentos por parte de las industrias y de las entidades encargadas del control. Muchos países tienen establecido dentro de su legislación “cero tolerancia” para *Salmonella* (Stocki *et al.*, 2007) y los métodos para su detección son variados.

2.12 Aislamiento

La detección de *Salmonella* en alimentos, se describe en un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:

Pre-enriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.

Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

2.13 Serotipificación

Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo (NOM-114-SSA1-1994).

La serotipificación constituye un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico permite determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, también es de utilidad, para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión (Terragno *et al*, 2003).

Desde el punto de vista genético, el género *Salmonella* constituye una sola especie siendo el grupo más complejo de la familia Enterobacteriaceae (Biberstein y Chung Zee, 1990).

Las técnicas serológicas son comúnmente empleadas para identificar cultivos desconocidos con sueros conocidos, *Salmonella* sp. esta serotipificada de acuerdo a sus antígenos somáticos de superficie (LPS, antígenos O), antígenos flagelares (proteínas, antígenos H) y antígeno capsular (Vi) (Terragno *et al*, 2003).

2.14 Pruebas rápidas para la identificación de *Salmonella*

Se han desarrollado distintos procedimientos nuevos para identificar la presencia de *Salmonella* más rápidamente. Aunque estas pruebas son, evidentemente, más cortas que las convencionales, todas requieren pre-enriquecimiento y/o enriquecimiento de la muestra antes de ser aplicadas (Pascual y Calderón, 2000).

Se usan y comercializan numerosos métodos alternativos de detección de *Salmonella*. Estos incluyen métodos basados en la conductancia eléctrica, en la separación inmunomagnética (IMS), en los ensayos de inmunoenzimas (ELISA), métodos de la PCR con sondas génicas, incluyendo la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y en la PCR en tiempo real o cuantitativa. Muchos de estos métodos no han sido validados para muestras fecales y ambientales, y resultan más adecuados para el análisis de alimentos humanos. Los métodos rápidos suelen ser más costosos que los cultivos convencionales, pero pueden resultar económicamente viables para analizar materiales donde se espera una prevalencia baja de contaminación o donde los materiales, como los alimentos, están pendientes de una prueba negativa (OIE, 2008).

Un método de enriquecimiento/IMS en combinación con un ELISA o PCR puede proporcionar resultados en 24 horas. En la actualidad, ninguno de los métodos rápidos se ha mostrado adecuado para la detección directa de *Salmonella*, de modo que se necesitan etapas de enriquecimiento selectivo o no selectivo. Esto introduce más pasos en el proceso de detección y requiere más tiempo para el operador. En los métodos basados en el ADN, la inhibición de la reacción de la PCR por elementos de la matriz de la muestra, especialmente

en el caso de las heces, resulta problemática y requiere técnicas adecuadas de extracción del ADN. Los métodos de aislamiento rápido pueden también estar ligados a sistemas de detección sofisticados, como biosensores. En los métodos rápidos para detección de *Salmonella* hay muchas variaciones y avances, pero ninguno parece reemplazar satisfactoriamente al cultivo en todas las circunstancias. Actualmente se están haciendo esfuerzos para estandarizar a nivel internacional el empleo de algunos métodos rápidos, pero todavía existe una cantidad considerable de trabajo pendiente (OIE, 2008).

a) Pruebas serológicas

- Identificación serológica de *Salmonella* aislada de animales y explotaciones contaminadas

Se han desarrollado varias pruebas serológicas para diagnosticar las infecciones por *Salmonella* en animales. En aves, para la identificación de granjas infectadas con *S. pullorum/gallinarum*, se han utilizado con éxito durante más de 50 años la prueba de sangre completa, que utiliza un antígeno teñido, y la prueba de aglutinación sérica (SAT). Como *S. Enteridis* posee el mismo antígeno somático del grupo D que *S. pullorum/gallinarum*, la prueba de sangre completa y otras relacionadas pueden utilizarse en el diagnóstico de la infección, pero la sensibilidad es baja. Se han desarrollado otras pruebas, como las de tipo ELISA, para el diagnóstico de las infecciones por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* y para otros serotipos de animales de granja (Van, *et al.*, 1992).

Los ensayos ELISA se han utilizado con eficacia para identificar serológicamente ganado portador de *S. dublin* y se pueden aplicar a la leche sin tratar, para analizar ganado estabulado de producción láctea. En Dinamarca se utiliza un ELISA mixto con suero o fluido tisular liberado por congelación y descongelación de muestras de músculo para detectar infecciones de *Salmonella* en cerdos. Se utiliza una prueba similar para detectar anticuerpos contra *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en la yema de huevo de gallinas en explotaciones comerciales de ponedoras. Algunas pruebas ELISA son actualmente de uso rutinario y se han comercializado varias, ya que se requiere la estandarización de su utilización (Feld, *et al.*, 2000).

- Factores que influyen en el diagnóstico serológico

1. Los métodos serológicos pueden utilizarse para identificar poblaciones afectadas más que para identificar animales individualmente enfermos, aunque se pueden emplear pruebas repetidas en la explotación como una ayuda para seleccionar los animales portadores crónicos. Normalmente, las pruebas serológicas se diseñan para detectar un número limitado de serotipos o serogrupos de *Salmonella* (OIE, 2008).

2. Se sabe que algunos animales con respuesta serológica positiva no pueden ser infectados de nuevo por *Salmonella*. De modo similar, animales que excretan activamente *Salmonella* pueden ser serológicamente negativos. También se aplican consideraciones similares a los métodos de cultivo bacteriológico, y así, los cultivos fecales con resultados negativos no indican necesariamente que el animal no está infectado. Sin embargo, ninguna de estas situaciones debe considerarse como un problema importante si se realizan suficientes pruebas. Los animales que son serológicamente positivos pueden haber cesado de excretar *Salmonella* aunque las concentraciones de inmunoglobulinas circulantes pueden permanecer altas. Otros animales de la granja pueden estar todavía infectados. Los animales serológicamente negativos pueden ser el resultado de una infección reciente que origine la excreción antes de que la producción de inmunoglobulinas sea máxima, o de una infección con serotipos menos invasivos. Con toda probabilidad, los animales que han sido infectados recientemente serán detectados serológicamente por un programa adecuado de análisis a lo largo de la vida de la explotación (OIE, 2008).

3. Los animales recién nacidos son inmunológicamente inmaduros y no responden serológicamente al antígeno somático LPS hasta las 2–3 semanas de edad. Sin embargo, sí producen una respuesta serológica a los antígenos de la proteína flagelar. El ganado bovino puede no responder serológicamente hasta las 10–12 semanas de edad y es posible que los lechones no desarrollen una respuesta inmune o posean una respuesta de anticuerpos que refleja la inmunidad materna. Las respuestas diferenciadas que implican diferentes clases de anticuerpos (IgM, IgA, IgG) pueden utilizarse en cerdos para distinguir las infecciones recientes de las antiguas, pero con frecuencia eso no es de utilidad para ensayar piaras en las que los individuos se hallan normalmente en diferentes fases de la infección. La mayoría de las pruebas se basan en la IgG, y es típico que aparezcan elevados niveles de anticuerpos entre 1 y 3 semanas después de la infección y que duren entre 2 y 3 meses.

Los pollos pueden también adquirir pasivamente anticuerpos anti-*Salmonella* de sus progenitores a través del saco vitelino; esto puede indicar que la población de los padres estaba infectada. Los mamíferos pueden adquirir anticuerpos de la madre a través del calostro (OIE, 2008).

4. Durante muchos años se ha utilizado la inmunización para controlar ciertas infecciones por *Salmonella* en animales de granja y, si se emplea serología en el diagnóstico, es necesario diferenciar entre la respuesta a la vacuna y a una infección real. Muchas vacunas vivas que se administran oralmente no proporcionan una respuesta de anticuerpos séricos significativa en la mayoría de los animales, pero puede haber excepciones ocasionales. Las vacunas muertas inyectables utilizadas para el control de *S. Enteritidis* en pollos pueden producir una respuesta de anticuerpos muy prolongada. Sería muy provechoso el fabricar

una vacuna viva marcada la cual se pudiera diferenciar del desafío de campo mediante pruebas serológicas (OIE, 2008).

5. El efecto de la terapia con antibióticos en la respuesta serológica no está claro. Algunos investigadores encuentran títulos reducidos después de la terapia, mientras que otros no detectan efecto alguno. No obstante, si se ha empleado terapia antimicrobiana, la serología puede ser una técnica de diagnóstico para la salmonelosis más útil que el cultivo (OIE, 2008).

6. Existen aproximadamente 2.500 serotipos diferentes de *Salmonella*. Dependiendo del antígeno y de la prueba utilizada, pueden ocurrir reacciones serológicas cruzadas entre diferentes serotipos, por ejemplo entre *S. Typhimurium*, *S. Pullorum* y *S. Enteritidis*. En algunos casos pueden ocurrir reacciones cruzadas como resultado de la exposición a microorganismos distintos de *Salmonella* (OIE, 2008).

7. En las aves, la yema del huevo se puede utilizar para detectar inmunoglobulinas frente a *Salmonella*, y los huevos representan, por tanto, un método para analizar explotaciones. En Dinamarca se emplea esta estrategia para controlar explotaciones comerciales de ponedoras. En el ganado bovino, se puede utilizar la leche para la detección de anticuerpos anti-*Salmonella* para analizar las explotaciones de producción láctea (OIE, 2008).

8. La utilización de discos de papel de filtro para recoger suero elimina la necesidad de separar el suero. Los discos también permiten la conservación a largo plazo y reducen los costos de transporte al laboratorio. La sensibilidad de la prueba puede resultar levemente reducida en comparación con las pruebas realizadas con suero fresco (OIE, 2008).

- La prueba de sangre completa

La prueba de sangre completa es una prueba rápida para la tifosis aviar y la pulorosis que puede utilizarse en la granja. La sensibilidad de esta prueba es baja y, sin experiencia, se pueden registrar muchos resultados como falsos positivos y falsos negativos (OIE, 2008).

- Prueba rápida de aglutinación en placa

Los sueros problema deben estar libres de contaminantes y de hemolisis. Puede ser conveniente centrifugar las muestras de suero que se hayan mantenido guardadas por algún tiempo.

Si se sospecha la existencia de reacciones falsas positivas inespecíficas, los sueros positivo/sospechosos deben probarse de nuevo después de una inactivación térmica a 56°C durante 30 minutos (OIE, 2008).

- Prueba de aglutinación sérica

La SAT es relativamente poco sensible, y muchos animales viejos tienen niveles bajos de aglutininas en sus sueros debido a enterobacterias distintas a *Salmonella*. Las muestras aisladas carecen de valor diagnóstico excepto como muestras para el examen inicial del rebaño. Se necesitan muestras pareadas como requisito mínimo para confirmar una infección activa. La prueba es relativamente barata; los antígenos se pueden preparar con facilidad y no se requiere un equipo costoso. La SAT se puede adaptar a formato de microtitulación y se puede utilizar para determinar títulos somáticos o flagelares. Se recomienda utilizar para SAT un suero estándar y otros métodos confirmativos para el control de la pureza y la inmunogenicidad de las preparaciones de antígeno(s) para SAT, que no dependan de los sueros producidos a partir de dichos antígenos (OIE, 2008).

b) ELISA para *Salmonella Enteritidis*

Para la detección de IgG (IgY) específica para *S. Enteritidis*, existen dos sistemas básicos principales: el ELISA indirecto y el ELISA competitivo “tipo sandwich”.

Ambos sistemas presentan ventajas y desventajas. El ensayo indirecto es más simple y hay reactivos disponibles para todos los serotipos de *Salmonella* de pollos, pavos, patos y mamíferos.

Ambos tipos de ensayo pueden utilizarse con suero, yema de huevo o sangre seca reconstituida. En Dinamarca y otros países se emplea un ELISA mixto (o ELISA de jugo de carne) para detectar infecciones de *Salmonella* en cerdos. Este ELISA contiene los antígenos “O” de tipo 1, 4, 5, 6, 7 y 12 del LPS de *S. Typhimurium*, lo que capacita al ensayo para detectar serológicamente el 95% de los serogrupos de *Salmonella* que se encuentran en los cerdos de la mayoría de países europeos. También se han añadido antígenos del grupo D a algunos kits para ELISA. El suero se utiliza para analizar granjas de producción y multiplicación, mientras que, para cerdos en el matadero, se realiza el ensayo con el fluido tisular (“jugo de carne”) que se libera cuando se descongelan 10 g de muestra de músculo congelado (Nielsen, *et al.*, 1998)

Los ELISA están adaptados a la automatización y, por tanto, a programas de muestreo a gran escala. Un problema importante es que se necesita un equipo costoso, y muchos de los reactivos son también caros. Hay varias preparaciones ELISA y ELISA-mixtas comercializadas para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y Grupo B/C. En teoría, estas deberían validarse mediante ensayos internacionales coordinados antes de adoptarse a efectos de control (Van, *et al.*, 1992).

c) Pruebas de ADN

El avance en la biotecnología ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares para el estudio del genoma de *Salmonella*. Los primeros resultados manifiestan la presencia de

secuencias de inserción. Asimismo, estos estudios han permitido diseñar primers específicos de estas regiones y poder, utilizarlos en la identificación específica de *Salmonella* a través de métodos de amplificación como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Calva, 2001).

d) Pruebas rápidas para el diagnóstico de *Salmonella* de venta en el mercado

Actualmente en el mercado se encuentran a la venta algunas pruebas rápidas para el diagnóstico de *Salmonella* las cuales permiten acortar el tiempo de diagnóstico, algunas de estas pruebas se muestran en el cuadro 5.

CUADRO 6.- Pruebas rápidas para el diagnóstico de *Salmonella* de venta en el mercado.

PRUEBA	TIPO DE PRUEBA
1-2 TEST	Inmunodifusión
SALMONELLA TEST	Inmunocromatica
BBL CRYSTAL	Bioquímica
PHADEBACT SALMONELLA	Inmunocromatica
BIO – SALMONELLA	Inmunocromatica
IDEXX	ELISA
OXOID SALMONELLA LATEX TEST	Aglutinación
MICROSTICK – SALMONELLA	Inmunoensayo

(Metodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en agua., 2013)

- Ventajas de los métodos rápidos

Liberar lotes rápidamente

Ahorro de costo financiero

Disminución de Trabajo manual

Facilidad en la ejecución de ensayos

Análisis de cantidades importantes

Menor espacio en almacenes o depósitos

(Metodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en agua., 2013)

- Desventajas de los métodos rápidos

Son utilizados para confirmar los resultados positivos

Falta de disponibilidad en el mercado

Algunos de estos métodos también detectan los microorganismos muertos

Se trata por lo regular de métodos cualitativos y por lo tanto no es posible correlacionar el resultado con la intensidad de la contaminación

(Metodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en agua., 2013).

Existen pruebas rápidas o Kits que ayudan en el diagnóstico de *Salmonella*, una de las cuales es:

1-2 Test de Biocontrol Systems

Es una prueba rápida para la detección de *Salmonella* en alimentos y bebidas. Es el método más reconocido a nivel mundial. Ofrece resultados de 18 horas a 24 horas, después del pre-enriquecimiento. Los resultados son visuales y fáciles de interpretar, no requiere ningún equipo. Cada kit viene con todo lo necesario para llevar a cabo la prueba. Está aprobado por la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC).

BBL CRYSTAL

El sistema BBL Crystal para la identificación (ID) de bacterias gram-positivas (GP) es un método de identificación en miniatura que utiliza sustratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos modificados. Se ha diseñado para la identificación de bacterias aerobias gram-positivas aisladas frecuentemente de muestras clínicas.

2.15 Identificación de *Salmonella* por PCR

Este método, a diferencia de los métodos tradicionales que requieren 6 o 7 días para dar un resultado definitivo, permite obtener los resultados en sólo 1 a 3 días, dependiendo de diversas modificaciones en el protocolo de trabajo, permitiendo la detección e identificación rápida y precisa de *Salmonella* (Pérez, *et al.*, 2008).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica *in vitro* que se basa en la capacidad de la ADN polimerasa en copiar una cadena de ADN. Mediante esta técnica un fragmento específico de ADN se amplifica debido a la utilización de dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), normalmente de entre 20 y 30 nucleótidos, cuyas secuencias coinciden con los extremos del fragmento de interés. El ADN se amplifica mediante un proceso cíclico que consta de tres pasos: primero el ADN molde de doble cadena es desnaturalizado a altas temperaturas convirtiéndolo en ADN de cadena sencilla. Después, los dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores) se anillan en hebras opuestas del ADN a una temperatura que solo permite la hibridación con la diana correcta. Por último, se sintetiza una nueva hebra de ADN utilizando los oligonucleótidos como iniciadores para la ADN polimerasa y utilizando el ADN diana como molde. De este modo se genera otra vez ADN de doble cadena. En los siguientes ciclos los iniciadores se unirán tanto al ADN original como al de nueva síntesis, por lo que el número de copias del fragmento comprendido entre los dos iniciadores aumentará de forma exponencial. Aun habiendo una única copia de ADN molde en la mezcla de reacción de PCR, en unas horas se pueden generar millones de copias (Hanna, *et al.*, 2005).

Los resultados de la PCR se detectan tradicionalmente (PCR convencional) mediante electroforesis en geles de agarosa seguido de la tinción del gel con algún agente intercalante, como el bromuro de etidio, o mediante tinción fluorescente. Uno de los principales inconvenientes que tiene la técnica de PCR es que en ocasiones, y sobre todo en condiciones poco estrictas, pueden ocurrir amplificaciones no específicas por la unión de los iniciadores a otras zonas del ADN problema. También se pueden formar dímeros de los iniciadores, que se detectan como productos no específicos. Por otro lado, al tener que visualizar los resultados mediante electroforesis en geles de agarosa, pueden ocurrir contaminaciones entre los productos de PCR (Hanna, *et al.*, 2005). Aunque mediante PCR se pueden detectar los ácidos nucleicos de un único organismo, el volumen de 1-10 µl de muestra que normalmente se utiliza en la reacción restringe el límite de detección a 10^3 células. La reacción de PCR, es una técnica *in vitro* que se basa en la capacidad de la ADN polimerasa en copiar una cadena de ADN. Mediante esta técnica un fragmento específico de ADN se amplifica debido a la utilización de dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), normalmente de entre 20 y 30 nucleótidos, cuyas secuencias coinciden con los extremos del fragmento de interés. El ADN se amplifica mediante un proceso cíclico

que consta de tres pasos: primero el ADN molde de doble cadena es desnaturalizado a altas temperaturas convirtiéndolo en ADN de cadena sencilla. Después, los dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores) se anillan en hebras opuestas del ADN a una temperatura que solo permite la hibridación con la diana correcta. Por último, se sintetiza una nueva hebra de ADN utilizando los oligonucleótidos como iniciadores para la ADN polimerasa y utilizando el ADN diana como molde. De este modo se genera otra vez ADN de doble cadena. En los siguientes ciclos los iniciadores se unirán tanto al ADN original como al de nueva síntesis, por lo que el número de copias del fragmento comprendido entre los dos iniciadores aumentará de forma exponencial. Aun habiendo una única copia de ADN molde en la mezcla de reacción de PCR, en unas horas se pueden generar millones de copias (Hanna, *et al.*, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN.

La Salmonelosis es considerada un problema de salud pública el cual afecta principalmente al sector más vulnerable como son los niños, adultos mayores y animales de abasto para consumo humano, por esta razón es importante realizar investigaciones las cuales puedan orientar y ayudar en la detección temprana de los microorganismos, con la ayuda de pruebas eficaces que puedan dar un resultado en un tiempo no muy largo, sean confiables en cuanto a su especificidad, y tengan un costo accesible, de esta forma al contar con este tipo de pruebas diagnósticas se lograría prevenir la aparición de brotes y permitiría implementar controles previos a la ocurrencia de la enfermedad (Pérez *et al.* , 2008).

La *Salmonella* es una bacteria de muy fácil difusión en una explotación animal, esto provoca una pérdida considerable en la producción, además de que afecta a todas las etapas de la cadena productiva.

La Salmonelosis se considera un problema grave en la salud animal y humana, ya que perjudica a una gran variedad de especies animales, los cuales se ven infectados por una o varias serovariedades pertenecientes a este género bacteriano, cabe señalar que el mal manejo de los productos para consumo humano así como las malas prácticas de higiene personal permiten su transmisión al consumir alimentos de origen animal contaminados (Khan *et al.*, 2000)

La preocupación aumenta debido a la aparición de cepas del género *Salmonella* con una multirresistencia a los antibióticos por lo que hace difícil su tratamiento, control y erradicación de la unidades productivas (Borie, 1998).

En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*, por falta de un sistema de vigilancia y comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, que impide que se puedan identificar las principales serovariedades de *Salmonella*, en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que cada una de éstas representa para la salud de los seres humanos. Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer el diagnóstico.

El aumento en la incidencia de *Salmonella*, es un problema tanto de salud pública como en la salud animal, es por ello que se deben buscar e implementar nuevas técnicas de diagnóstico, rápidas y eficaces para la detección y control oportuno de esta zoonosis. La comunidad científica y las autoridades sanitarias, asumen, que en general, los pollos, cerdos y bovinos son los reservorios más frecuentes de esta bacteria por lo que la ingestión de

alimento directa o indirectamente contaminado de estas especies, es la causa más común de las infecciones en el humano; la cual ha mostrado un incremento significativo en este siglo.

El uso de las pruebas rápidas ayuda a una detección oportuna y en poco tiempo detectar el agente, con esto podemos evitar brotes, ya que estas pruebas cuentan una especificidad buena la cual nos brindará un diagnóstico confiable, en menor tiempo y a un costo accesible.

IV. HIPÓTESIS.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene una mayor especificidad y sensibilidad que las técnicas rápidas (Kits comerciales) para el diagnóstico de *Salmonella Typhimurium* en carne.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Realizar una comparación de sensibilidad y especificidad entre PCR y las pruebas rápidas 1-2 Test y BBL Crystal para el diagnóstico de *Salmonella Typhimurium* en productos cárnicos.

Objetivos específicos

- Identificar que prueba es más sensible y específica para el diagnóstico de *Salmonella*.
- Elaborar tabla de contingencia 2 x 2 para calcular la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de *Salmonella*.
- Realizar un análisis comparativo de tiempo y costos de las pruebas a analizar.

VI. MATERIAL.

Material Biológico:

- Cepa de referencia de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
- Muestras de carne molida de bovino

Material de Laboratorio:

a) Medios de cultivo

- Agar MacConkey
- BHI

b) Cristalería

- Tubos de ensaye de tapón de rosca de 13 x 100 mm
- Probetas graduadas 10 y 1000 mL
- Vaso de precipitado graduado de 500 mL
- Embudo
- Pipetas graduadas de 10mL
- Cajas Petri

c) Material de plástico

- Viales para PCR
- Viales de 1.5mL
- Tubos cónicos con tapa de rosca de 50 mL
- Puntas de 200 y 1000 µl

d) Equipo

- Autoclave
- Estufa bacteriológica (Riossa)
- Baño María en seco (Thermolyne)

- Microcentrifuga (Eppendorf)
 - Cronómetro
 - Balanza Analítica
 - Refrigerador
 - Congelador de – 20 °C
 - Vórtex
 - Micropipetas 0.5-10, 5.0-50, 20-200, 200-1000 µl
 - Cámara de electroforesis (Life Technologies)
 - Campana para PCR (Hamber Clasing)
 - Termociclador (Labnet)
 - Transluminador de luz UV (DNR Mini Bis Pro)
 - Cámara fotográfica para el análisis de los geles Agarosa (Kodak)
 - BBL CRYSTAL (Panel Viewer)
- e) Reactivos
- Agua destilada
 - Agarosa
 - Solucion amortiguadora (PBS) pH 7.4
 - NaOH
 - Tris-EDTA
 - Agua inyentable
 - Buffer de PCR libre de magnesio (Fermantas)
 - Desoxiribonucleotidotrifosfato (DNTPS) (10%) (Master Mix/ Promega)
 - *Taq* polimerasa (Promega)

- Primers
 - ✓ BR – SAL 1A 5' GTT CGG CAT TGT TAT TTCT – 3'
 - ✓ BR – SAL 1B 5' CTC AGG GTC ATC GTT ATTC – 3'
- Buffer de carga (TBE 1x)
- Marcador de peso molecular 50- 1000 pb (Promega)

VII. MÉTODO

Se realizó la detección de *Salmonella Typhimurium* a partir de muestras de carne molida inoculas con una cepa de referencia *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, se procedió conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

Para ello se pesaron de forma aséptica 425gr de carne molida de bovino los cuales se dividieron en quince partes iguales (25 grs c/u) las muestras se inocularon con 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 UFC (unidades formadoras de colonias) de *Salmonella Typhimurium* y los 50grs restantes de carne se usaron como control negativo (Agua destilada).

Para la preparación del inóculo se tomaron 4 ó 5 colonias aisladas y de igual morfología (*Salmonella Typhimurium*) de un medio de aislamiento primario preparado 24hrs antes (agar MacConkey), posteriormente se preparó una suspensión en 5 mL de caldo peptonado se adiciono parte de las colonias aisladas en el caldo. Para esta operación se utilizó un asa bacteriológica. Se incubo el recipiente del cultivo a 35-37 °C hasta que se alcanzó a observar la turbidez del estándar equivalente al 0.5 de Mc Farland (2 - 4 h). Se utilizó, la escala de Mac Farland para lograr hacer las diluciones a diferentes concentraciones de UFC (unidades formadoras de colonias) dicha escala se utiliza como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro, o UFC según una escala que va de 0.5 a 10. En nuestro caso 0.5 correspondió a 10^1 y 10 a 10^5 UFC.

Para lograr los concentración deseada de UFC, se tomó 1 mL de la suspensión enriquecida con caldo peptonado, la cual se dejó reposar hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 de Mc Farland, posteriormente se agregó ese mL a 9 mL de BHI obteniendo así la dilución 10^1 , de esta primera dilución se toma un mL y se agrega a otros 9mL de BHI en otro tubo de esta forma obtenemos 10^2 , y así sucesivamente hasta obtener la dilución 10^5 , viendo en el spectronic 21 D la absorbancia de 0.5 a 10.

Teniendo listos los tubos ya con su respectiva dilución se procedió a realizar tres grupos con 5 partes de carne de 25grs cada grupo, el GRUPO 1 se analizó mediante la prueba 1- 2 Test de Biocontrol Siystems, Grupo 2 por BBL Crystal y el GRUPO 3 fue analizado por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Teniendo listo e identificado cada grupo se tomó el Grupo 1 y se inoculo cada una de las 5 unidades de carne de 25 grs agregando 10 μ L del tubo correspondiente (inoculo) de la concentración menor a la mayor (de 10^5 a 10^1). Este paso se repitió con los 2 grupos restantes.

Posterior a esto se empezó a analizar cada una de las muestras con su respectiva prueba, esperando los resultados arrojados por estas, para realizar el análisis de sensibilidad y especificidad de cada prueba lo cual se logró mediante la tabla de contingencia 2x2.

Y por último se realizó una comparación de tiempo y costos de cada prueba, lo cual permitió tener un mejor panorama y conocimiento de cada una de las pruebas analizadas.

Extracción de ADN para la detección de *Salmonella Typhimurium* en carne molida.

La extracción de ADN se realizó empleando un Kit comercial (Insta Gene Matrix), siguiendo el protocolo descrito por la empresa.

Una vez realizada la obtención de ADN se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Protocolo de amplificación por PCR

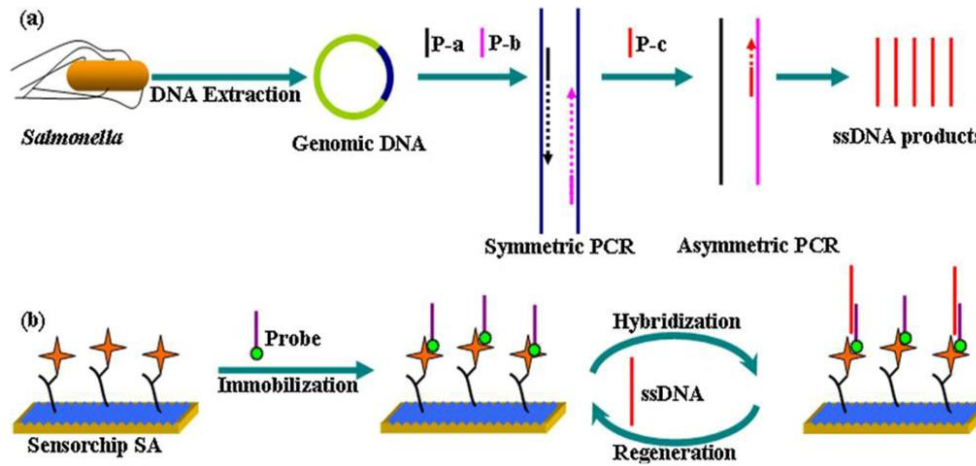
La preparación de la muestra se realizó en un tubo para PCR se agregaron los siguientes reactivos: Master Mix, los iniciadores, el agua y ADN. Cuadro 7.

CUADRO 7. Preparación de reactivos

REACTIVO	CANTIDADES
MASTER MIX	12.5 µL
P1 (BR-SALA)	1 µL
P2 (BR- SALB)	1 µL
H₂O	8.5 µL
ADN	2 µL

Las reacciones se sometieron a una preincubación a la temperatura de 95°C por 5 minutos posteriormente se procedió a hacer 20 ciclos con una desnaturalización de 95 °C por 1 minuto. Alineación de los primeros a 48 ° C por 30 segundos y una extensión de ADN a 72 °C por 30 segundos en cada ciclo, al finalizar los ciclos las reacciones se incubaron por 3 minutos a 72 °C y posteriormente se bajó la temperatura a 4 °C para la conservación la muestra, utilizando los siguientes Primers BR – SAL 1A 5´ GTT CGG CAT TGT TAT TTCT – 3´ y BR – SAL 1B 5´CTC AGG GTC ATC GTT ATTC – 3´ (Yang, *et al.*, 2001).

FIGURA 3. Ilustración esquemática de la estrategia para la detección de *Salmonella*.



(BIOSENSORS, 2013).

Electroforesis y visualización de los productos amplificados

La visualización de los productos de amplificación se llevó a cabo en geles de agarosa al 2% en tampón de electroforesis TBE 1X. El volumen de carga utilizado fue de 2 μ L de Buffer y se depositaron en papel parafilm, posteriormente se depositan 5 μ L del ADN amplificado, y se mezclan con la pipeta, se empieza a cargar cada uno de los pozos del gel de agarosa empezando por el segundo ya que en el primer pozo se depositaran 3 μ L del marcador de peso molecular.

La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 90 voltios durante 90 minutos

Posteriormente se realizó la lectura del gel en el trasluminador de luz UV DNR Mini Bis Pro. Observando la formación de bandas positivas a la detección del gen *InvA* dicho gen se relaciona con el proceso de invasión al epitelio intestinal. El gen *InvA* es un blanco ideal para la aplicación de métodos moleculares basados en la PCR, que permiten detectarlo en aguas y alimentos y distinguir entre aislamientos bacterianos patogénicos y no patogénicos.

1-2 TEST DE BIOCONTROL SYSTEMS

El principio de 1-2 Test tiene base en la observación de la inmovilización de la *Salmonella* por anticuerpos polivalentes H (flagelar) en el medio de movilidad, con la formación de una banda visual bien definida (Imunobanda).

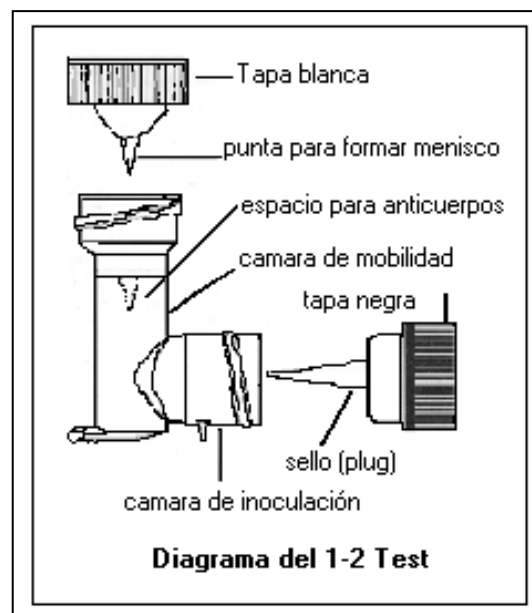
La prueba tiene dos compartimientos. La muestra pre-enriquecida es inoculada en la cámara menor. La cámara mayor contiene un medio gel de movilidad no selectivo, base de peptona. La cámara de movilidad es cerrada con una tapa con una punta para formar el

menisco en el gel, para la adición de la solución de anticuerpos. La comunicación entre las cámaras está cerrada con un plug, que debe ser retirado y descartado antes de la adición de la muestra (Figura 4).

La *Salmonella* presente en el caldo tetratonato - verde brillante se mueve de la cámara de inoculación, dentro del gel de movilidad para reaccionar con los anticuerpos y formar la inmunobanda.

El gel del 1-2 Test está compuesto por 5.0g peptona, 1.0 sales biliares, 10.0 g CaCO_3 y 30.0 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en 1 L de H_2O . Ajustando a un pH de 7.4 – 7.6. 1.0 mL 1 % de verde brillante y 20.0 mL de solución de yoduro se separaran 9 mL en los tubos del test de 16 x 15 mm

FIGURA 4. Diagrama del 1-2 Test



(Sdix, R. C. S., 2010)

Forma de Uso:

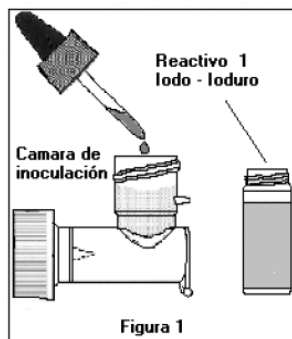
- Colocar el 1-2 Test con la tapa negra para arriba y sacar la tapa. Adicionar 1 gota del Reactivo 1 (yodo – yoduro) en la cámara de inoculación. Colocar la tapa y agitar para mezclar (Figura 5).
- Colocar el 1-2 Test con la tapa negra para arriba sacar la tapa. Sacar el plug de la cámara de inoculación con una pinza estéril, descartar el plug (Figura 5). Si este

plug no es sacado, la bacteria no es capaz de moverse desde la cámara de inoculación para la cámara de movilidad.

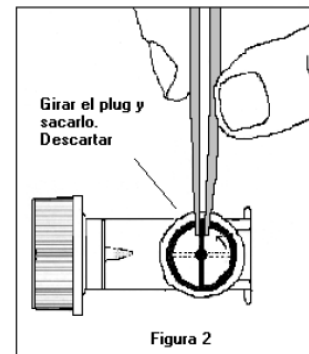
- c) Antes de la inoculación del kit, homogenizar el caldo de pre enriquecimiento. Utilice una pipeta con punta estéril para transferir 1.5 mL de la muestra enriquecida para la cámara de inoculación (Figura 5).
- d) Colocar el 1-2 Test con la tapa blanca para arriba, se saca la tapa, se corta la punta de la tapa con una tijera estéril y descartar la punta cortada (Figura 5).
- e) Adicionar 1 gota del Reactivo 2 (Anticuerpos) en el espacio formado por la tapa blanca en la cámara de movilidad. Volver a colocar la tapa blanca (Figura 5). Una gota del Reactivo 2 debe llenar dos terceras partes del espacio vacío del gel.

FIGURA 5. Método de uso 1-2 Test

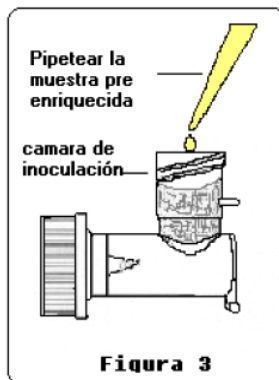
1. Adicionar la Solución de Iodo-ioduro



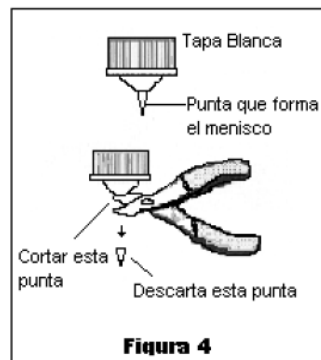
2. Sacar el plug que cierra la cámara de inoculación



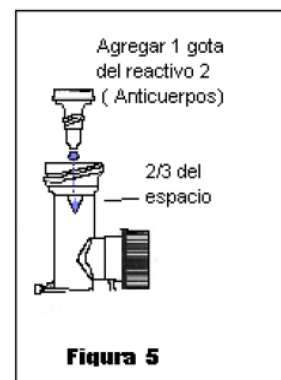
3. Inoculación



4. Cortar la punta en la tapa blanca



5. Agregar 1 gota de Anticuerpos



(Sdix, R. C. S., 2010)

Incubación: Incubar el 1-2 Test en incubadora con la tapa blanca hacia arriba. Se incubo a 35 °C por 18 horas. (Figura.6)

FIGURA 6. Incubación



(Sdix, R. C. S., 2010)

BBL Crystal Identification Systems Enteric/ Nonfermenter ID Kit

El sistema de identificación **BBL Crystal (ID)** de bacterias entéricas / no fermentadoras (E/NF) sirve para la identificación de bacterias aerobias gram-negativas que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae así como también de los bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores de glucosa aislados con más frecuencia.

El sistema **BBL Crystal E/NF ID** es un método miniaturizado de identificación. Muchos de los análisis utilizados son modificaciones de los métodos clásicos. Estos incluyen tests para la fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de diversos sustratos. Además, contiene sustratos unidos a un cromógeno para detectar las enzimas que utilizan los microbios para metabolizar distintos sustratos.

El Kit **BBL Crystal E/NF ID** está compuesto de:

- Las tapas del panel **BBL Crystal E/NF**
- Las bases **BBL Crystal**
- Los tubos de fluido (IF) de inóculo para organismos entéricos/heces **BBL Crystal ID**.

La tapa contiene 30 sustratos deshidratados en las puntas de los dientes. La base tiene 30 pocillos de reacción. El inóculo del análisis está preparado con el fluido de inóculo y se utiliza para llenar los 30 pocillos de la base. Cuando se alinea la tapa con la base y se cierra

en su lugar, el inóculo del análisis rehidrata los sustratos secos e inicia las reacciones del análisis.

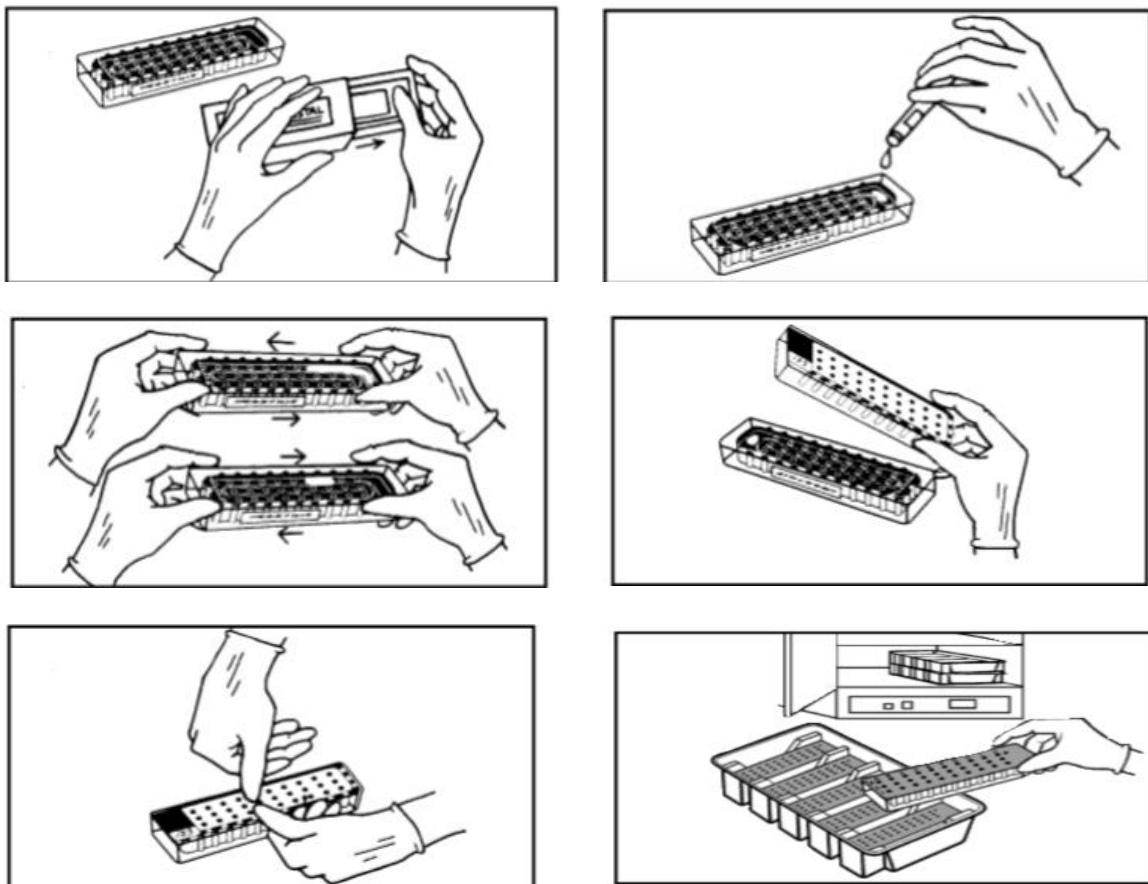
Después del periodo de incubación, se examinan los pocillos, para observar cambios de color. Los cambios de color se producen como resultado de actividades metabólicas de los microorganismos. El patrón resultante de las 30 reacciones se convierte en un número de perfil de diez dígitos que se utiliza como base para la identificación.

Procedimiento del análisis:

1. Secar las tapas de la bolsa. Desechar el secante. Una vez sacadas de la bolsa, las tapas cubiertas deben utilizarse en el plazo de 1 hora. No utilizar el panel si no hay secante en la bolsa (Figura 7).
2. Tomar un tubo de inóculo y etiquételo con el número de la muestra. Utilizando una técnica aséptica, con la punta de una torunda estéril de algodón o una varilla con aplicador de madera o asa de cultivo estéril de plástico tome una colonia grande bien aislada (con un diámetro de 2-3 mm o mayor) o 4-5 colonias más pequeñas de la misma morfología de una placa agar MacConkey (Figura 7).
3. Suspender las colonias en un tubo de fluido del inóculo **BBL Crystal** para organismos entéricos/heces (Figura 7).
4. Volver a taponear el tubo agítelo en un vortex durante aproximadamente 10-15 s (Figura 7).
5. Tomar una base y marque el número de muestra del paciente en la pared lateral (Figura 7).
6. Vertir todo el contenido del fluido de inóculo en el área objetivo de la base (Figura 7).
7. Sostener la base con ambas manos y mueva el inóculo suavemente de un lado para otro de las pistas hasta que se hayan llenado todos los pocillos. Haga retroceder cualquier líquido sobrante el área objetivo y coloque la base en la parte superior de un banquillo (Figura 7).
8. Alinear la tapa de forma que el extremo marcado de la tapa este en la parte superior del área objetivo de la base (Figura 7).
9. Apretar hasta que perciba una ligera resistencia. Coloque el pulgar en el borde de la tapa hacia la parte media del panel en cada lado y apriete simultáneamente hasta que la tapa encaje en su lugar (Figura 7).

10. Colocar los paneles inoculados en las bandejas de incubación. El tiempo de incubación es de 18 a 20 hrs a 32 – 37 °C.

FIGURA 7. Procedimiento de análisis BBL CRYSTAL



(Manual de operación de Sistemas de Identificación BBL Crystal ID Equipo para la identificación de bacterias grampositivas).

Lectura: Después del período recomendado de incubación, saque los paneles del incubador. Todos los paneles deben leerse hacia abajo (las ventanas más grandes arriba; la etiqueta mirando hacia abajo) utilizando la caja de luz o el visor del panel BBL Crystal. Consulte la tabla de colores de la reacción y/o el apartado de “Reactivos” para obtener una interpretación de las reacciones. Use el cuaderno de informes BBL Crystal E/NF para registrar las reacciones. Como método alternativo, puede utilizar el lector automático BBL Crystal para leer los paneles. El código arrojado por el cuaderno de informes es colocado en el software de lectura del BBL Crystal, arrojando el resultado del análisis.

Tabla de contingencia 2x2.

Desde el punto de vista del laboratorio, la sensibilidad de una prueba se refiere a la capacidad para reaccionar con solo un componente químico.

La especificidad se puede definir de como la probabilidad de que una prueba identifique, correctamente aquellos individuos que no están enfermos.

El cálculo de especificidad (E) y sensibilidad (S) se realizó utilizando la tabla de contingencia 2x2.

CUADRO 8. Tabla de contingencia 2X2

Resultado de PCR		Muestras probadas		
		Inoculada	No inoculada	Total
		a	b	a+b
		c	d	c+d
Total		a+c	b+d	n

López y Fernández, 2001.

En donde:

$$E = \frac{d}{(b + d)}$$

$$S = \frac{a}{(a + c)}$$

(López y Fernández, 2001).

VIII. LIMITE DE TIEMPO

PERIODO	ACTIVIDADES
Agosto 2014 – Diciembre 2014	Revisión y aprobación de protocolo de tesis
Febrero 2015 – Julio 2015	Ejecución de pruebas de laboratorio
Septiembre 2015 – Diciembre 2015	<ul style="list-style-type: none">• Análisis de resultados• Discusión• Conclusiones
Mayo 2016 – Junio 2017	Revisión y aprobación de documento concluido

IX. LÍMITE DE ESPACIO

El presente trabajo se realizó en las áreas de Inocuidad alimentaria y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, que se encuentra ubicado en el kilómetro 15.5 de la carretera Toluca-Atlacomulco, en donde se realizaron las pruebas de PCR y 1-2 Test. Y en el Laboratorio de Control de calidad GRIMANN VETERINARIA S.A. DE C.V Laboratorios SANFER que se encuentra ubicado en Av. San Francisco No.15 Lerma Estado de México, en donde se realizó la prueba de BBL Crystal.

X. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de dicha investigación arrojaron que de cinco muestras de carne inoculadas con *Salmonella* (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 UFC) todas la muestras dieron resultado positivo a *Salmonella* al aplicarse la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Obteniendo un 100% de especificidad y 100% en sensibilidad (cuadro 9 y figura 52). **BBL Crystal** dio resultados positivos a las cinco muestras analizadas por esta prueba dando como resultado un 80% de especificidad (ya que arrojó como resultado *Salmonella spp* a pesar que se manejó una ATCC de *Salmonella Typhimurium*) y un 100% de sensibilidad dicha prueba. (cuadro 10 y figuras 12 y 13).

Por el contrario los resultados obtenidos con la prueba rápida **1-2 Test** demostraron que la prueba inoculada con 10^3 dio un resultado negativo. Esta prueba tiene un 80% de sensibilidad y un 80% de especificidad. (cuadro 11). Se observa en las figuras 9, 10 la presencia de la inmunobanda la cual se generó por la presencia de *Salmonella* captando de esta forma la prueba el Anticuerpo Polivalente Flagelar (H), presente en las muestras contaminadas con 10^1 y 10^5 unidades formadoras de colonias. (UFC). Observando que tanto el rango máximo como el rango mínimo utilizado en este estudio fueron detectados.

También se logró observar que la muestra contaminada con 10^3 unidades formadoras de colonias (UFC), arrojó un resultado negativo figura 10.

En el manual de procedimientos de la prueba rápida se menciona que cuentan con un 10% de error, ya sea por contaminación de la muestra o la prueba no se encuentra en óptimo estado, aun con estas especificaciones esta prueba es una de las más usadas dentro del mercado para la pronta detección de *Salmonella* en los alimentos.

FIGURA 8. Presencia de inmunobanda positiva a *Salmonella*

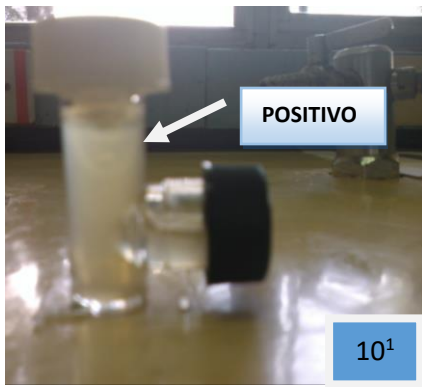


FIGURA 9. Presencia de inmunobanda positiva a *Salmonella*

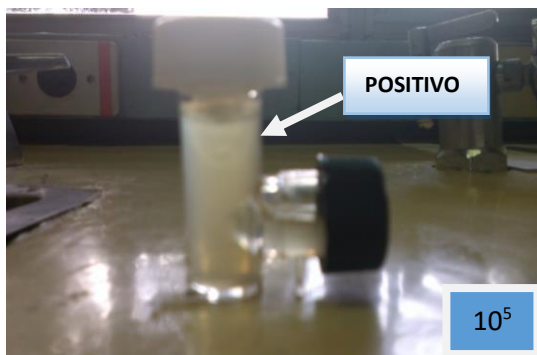
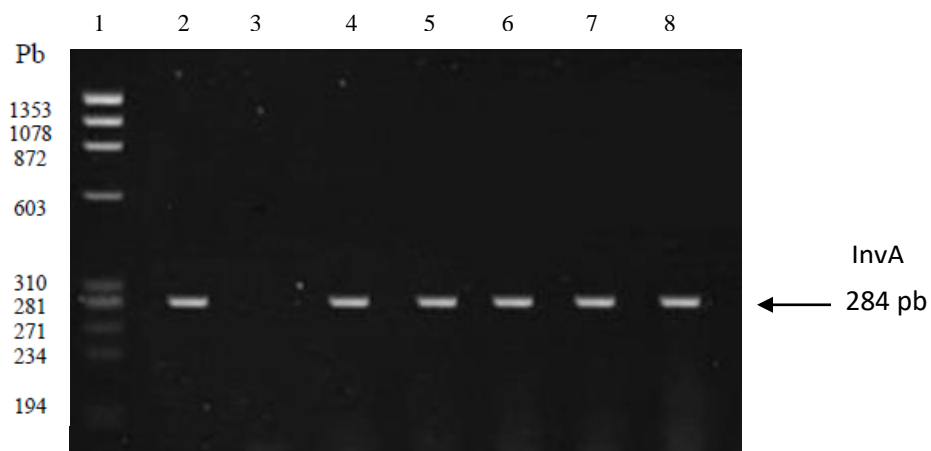


FIGURA 10. Ausencia de inmunobanda positiva a *Salmonella*



FIGURA 11. PCR detección de *Salmonella*



En la figura 12 podemos apreciar la amplificación de banda en gel agarosa. Pozos: 1) Marcador (Promega); 2) Control positivo cepa ATCC 14028 *S. Typhimurium*; 3) Control Negativo; 4) Dilución 10^1 ; 5) Dilución 10^2 ; 6) Dilución 10^3 ; 7) Dilución 10^4 ; 8) Dilución 10^5 .

En la figura13 el análisis bioquímico para *Salmonella Typhimurium* por la prueba de BBL Crystal, Una vez leída la prueba se procede a ingresar en el Software el código arrojado por la prueba de BBL Crystal y este Software nos arrojará el resultado de que bacteria se trata figura 14.

FIGURA 12. Análisis bioquímico de BBL CRYSTAL



FIGURA 13. Lectura de la muestra Software

A screenshot of the BBLCrystal Microbiology Interactive Database software interface. The window title is "BBLCrystal Microbiology Interactive Database [Revisión]". The menu bar includes "Acción", "USB", "Herramientas", and "Ctrl+Alt+Supr". The main area displays a table with patient data: Panel (ENF), Perfil (5404654171), Nombre Paciente (1), and Numero Acceso (1). Below the table, there are buttons for "Imprimir", "Borrar", "Pruebas sup", "Editar", and "Cerrar". A section titled "Registro actual" shows "[1] Salmonella species". To the right, "Validación de Biotipo" is 11 and "Factor de confianza" is .9679. A section titled "Estadística" shows "Informe de ID BBL Crystal basado en estas estadísticas." Below that, a "Mensaje" box states: "Salmonella species - Normalmente se requiere una confirmación serológica de Salmonella species." At the bottom, the "BBL Crystal E/NF 4.0" section shows the Perfil (5404654171), Oxidasa (checked), and Indol (checked).

ANALISIS DE LA TABLA DE CONTINGENCIA 2X2

CUADRO 9. Tabla 2X2 PCR

PCR	Inoculada	No inoculada (control negativo)	Total
POSITIVO	5	0	5
NEGATIVO	0	5	5
TOTAL	5	5	10

E= 100% S= 100%

CUADRO 10. Tabla 2X2 BBL CRYSTAL

BBL CRYSTAL	Inoculada	No inoculada (control negativo)	Total
POSITIVO	5	0	5
NEGATIVO	0	5	5
TOTAL	5	5	10

E= 80% S= 100%

Nota: La prueba es un 80% específica ya que no detecta como tal a *Salmonella Typhimurium* solo es detectada como *Salmonella spp.*

CUADRO 11. Tabla 2X2 1-2 Test

1-2 TEST	Inoculada	No inoculada (control negativo)	Total
POSITIVO	4	0	4
NEGATIVO	1	5	6
TOTAL	5	5	10

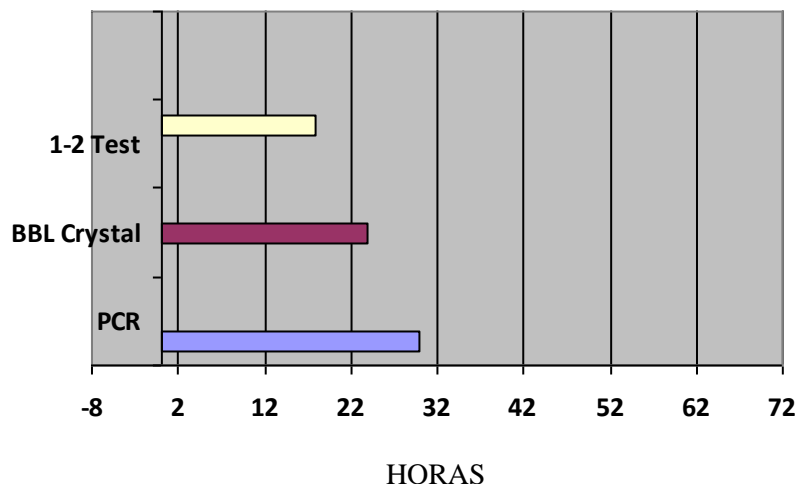
E=80% S=80%

Nota: La prueba es un 80% específica ya que no detecta como tal a *Salmonella Typhimurium* solo es detectada como *Salmonella spp.*

ANÁLISIS DE TIEMPO Y COSTOS 1-2 TEST DE BIOCONTROL SYSTEMS/ BBL Crystal Identification Systems Enteric/ Nonfermenter ID Kit/ PCR

Se pudo observar que las distintas técnicas empleadas para este trabajo tiene un rango distinto de tiempo para poder arrojar resultados y leer el análisis (BBL-Crystal y 1-2 Test de 18 hrs a 24hrs, PCR 24hrs a 72hrs) en la Grafica 1 se puede observar este dato.

GRÁFICA 1. Análisis del tiempo de las pruebas estudiadas

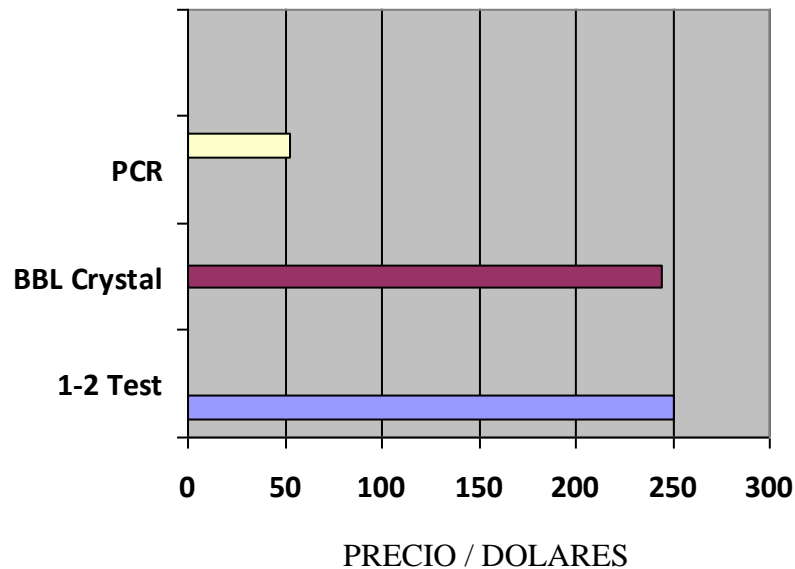


El análisis de costos ,(Grafica 2) presento un rango muy variado, el kit completo con 12 piezas de 1-2 Tets tiene un costo de \$3000 M/N, lo cual nos arroja un costo de \$250 M/N por tubo de muestra, esto varía de acuerdo con el precio del Dólar, existe un kit con 72 piezas y su costo es \$13, 575 M/N, dando un precio unitario de \$188.54 M/N, en el caso del presente estudio de adquirió el kit con 12 piezas.

El kit para BBL Crystal tiene un costo de \$4,890 M/N, siendo su precio unitario de \$244.50 M/N esto varía de acuerdo con el precio del Dólar, el precio es un kit con 20 pruebas.

La prueba de PCR tiene un costo de \$5,250 M/N aproximado, del cual el precio unitario es de \$52.50 M/N, esto varía de acuerdo con el precio del Dólar, el precio se calculó para 100 reacciones.

GRÁFICA 2. Análisis de costos unitarios en las pruebas estudiadas



XI. DISCUSIÓN

Una de las tareas fundamentales de los laboratorios de Inocuidad alimentaria y Farmacéuticos, es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el hombre. Con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso, el laboratorio aplica técnicas que permiten lograr la detección de estos patógenos. Dichos métodos están consolidados en los laboratorios de microbiología y en la práctica rutinaria diaria muestran algunas limitaciones que se observan de manera específica y más evidente para algún tipo de microorganismos. Los métodos moleculares permiten evitar algunas de estas limitaciones, si bien su implementación no es universal en todos los laboratorios. Este hecho se debe a un coste más elevado y al grado de especialización que se requiere para su aplicación, por lo que los métodos moleculares suelen estar centralizados en laboratorios o centros de referencia (Procedimientos en Microbiología Clínica, 2010).

Por otra parte, en el trabajo diario de estos laboratorios se necesitan soluciones rápidas y eficaces para la identificación de los microorganismos. Por ello, en los últimos años hemos observado crecimiento importante en la oferta de métodos rápidos aplicados al diagnóstico microbiológico.

Este trabajo de investigación tuvo como propósito comparar la especificidad y sensibilidad, además de realizar un análisis comparativo de tiempo y costo, de dos pruebas rápidas para la identificación de *Salmonella Typhimurium* a través de la prueba de inmunodifusión 1-2 Test de Biocontrol System y la prueba bioquímica BBL Crystal comparadas con un método molecular como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Dichas pruebas rápidas, son utilizadas a nivel mundial en la industria alimentaria y farmacéutica por su rapidez, seguridad, accesibilidad y en el caso la prueba rápida de inmunodifusión 1-2 Test Biocontrol System no es necesario algún tipo de software o equipo especial para dar lectura a la prueba, ya que a simple vista se puede observar la presencia de la inmunobanda de esta forma saber si la muestra es negativa o positiva a la presencia de *Salmonella*. Dicha prueba mostro una sensibilidad y especificidad de un 80% en donde 4 de 5 muestras, dieron un resultado positivo con presencia de inmunobanda (10^1 , 10^2 , 10^4 , 10^5 UFC), y un resultado negativo (10^3 UFC) con ausencia de inmunobanda. De esta forma se corrobora lo que cita la OIE (2008), con respecto a los métodos rápidos para detección de *Salmonella*, mencionado que existen muchas variaciones y avances, pero ningún método convencional puede ser reemplazado aún por alguna prueba rápida. Ya que estas no logran tener un 100% de confianza, por el manejo que se les da antes de la entrega

y durante el procedimiento del análisis de la muestra. Con respecto al análisis de tiempo se obtienen resultados de 18 a 24 horas y con un precio unitario aproximado de \$188.59 MN.

Por otro lado en el caso del BBL Crystal (prueba rápida) se necesita de un software especial para poder leer la muestra estudiada y dar un diagnóstico, pero cabe mencionar que una vez instalado el programa podemos analizar las muestras que deseemos ya que contaremos siempre con el software, sin la necesidad de volver a adquirirlo o instalarlo cada que queramos dar lectura a una nueva muestra. Este Kit mostró la misma sensibilidad del 100% que el PCR al dar un resultado positivo en las 5 muestras analizadas. En relación al PCR mostró una menor especificidad del 80%, al interpretar el resultado obtenido como *Salmonella spp.* Aun cuando se utilizó una cepa *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028. Respecto al análisis de tiempo se obtienen resultados de 18 a 24 horas y con un precio unitario aproximado de \$244.50 MN.

En cuanto a la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) podemos mencionar que tiene una ligera desventaja en cuanto a la pruebas rápidas ya que este método si presida de equipo especializado para poder dar lectura a las muestras analizadas como lo es un termociclador, cámara de electroforesis, lámpara UV solo por citar algunos de los equipos utilizados en dicho método, además de que se necesita de personal capacitado para poder realizar de manera correcta sin correr riesgo de contaminaciones el análisis de la muestra a estudiar. Dentro del estudio realizado todas las muestras analizadas por este método dieron un resultado positivo a la presencia de *Salmonella Typhimurium*, siendo esta técnica una de las mejores para la detección de esta bacteria debido a su especificidad y sensibilidad del 100% para la detección de agentes infecciosos; aparte de lograr detectar específicamente a *Salmonella Typhimurium*. Logrando obtener un diagnóstico de 1 a 3 días ya que el proceso del análisis del PCR es demasiado largo, por lo que incluye el enriquecimiento, la extracción de ADN, amplificación, electroforesis y lectura, mencionado en (Pérez *et al.* 2008). Con un precio unitario aproximado de \$52.50 MN.

De los resultados obtenidos en esta investigación, se puede deducir que la reacción cadena de la Polimerasa muestra una mayor especificidad y sensibilidad en comparación con las dos técnicas rápidas analizadas.

Sin embargo Armendáriz y Barreiro (2013) mencionan que la alta sensibilidad que confiere la técnica de PCR es también su limitación más seria ya que la amplificación exponencial de ADN puede conseguirse incluso a partir de una célula, cualquier resto celular o reactivos contaminados los cuales representan un riesgo de resultados falsos. Un claro ejemplo de reservorios importantes son los moldes “contaminados” con productos de reacciones previas de PCR.

En cuanto a las pruebas rápidas el hecho de acortar los tiempos de análisis no descarta la necesidad de confirmar los resultados positivos y negativos para un diagnóstico certero. En caso de utilizar pruebas rápidas para acortar tiempos al momento de realizar muestreos numerosos, se sugiere seleccionar al azar una prueba positiva y una negativa; para de esta forma analizar el funcionamiento correcto de nuestra prueba rápida. Una vez estandarizada la prueba más adecuada a las necesidades del laboratorio se implementara de forma rutinaria, en la cual verifiquemos el correcto funcionamiento de esta una vez al mes.

XII. CONCLUSIONES

De acuerdo a la tabla de contingencias 2x2 se puede concluir que la especificidad y sensibilidad de la Prueba de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es mayor a los resultados obtenidos por las dos pruebas rápidas BBL y 1-2 Test.

Se demostró que el tiempo estimado de las pruebas rápidas Biocontrol System (1-2 Test) y Crystal Identification System Enteric NonFermenter ID Kit (BBL) para dar un resultado es de 18 a 24 horas menor en comparación al PCR de 24 a 72 horas.

En cuanto al análisis de costos el PCR arrojó un costo aproximado de \$52.50 MN por prueba analizada, contrario al precio unitario al que se adquieren las pruebas rápidas precio que asciende a más de \$100 MN por prueba.

XIII.SUGERENCIAS

Realizar un estudio en el que se analicen todas las pruebas rápidas disponibles en el mercado para la detección de *Salmonella* y de esta forma comparar su especificidad y sensibilidad.

La creación de Normas las cuales permitan dar un seguimiento y control de las ETAs, de esta forma tener datos estadísticos más precisos.

XIV. LITERATURA REVISADA.

Álvarez, I. Niemira, Brendan A. Fan, Xuotong, Sommers, Christopher H. 2007. Inactivation of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Senftenberg in Liquid Whole Egg Using Generally Recognized as Safe Additives, Ionizing Radiation, and Heat. Journal of Food Protection®, Number 6, pp. 1316-1526.

AMEG. Asociación de Engordadores de Ganado. 2014. México. <http://www.ameg.org.mx/estadística/nacional/> (Consulta: mayo 2015).

Armendaríz, I. Z. E. Barreiro. 2013. Detección de *Salmonella* mediante PCR en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes. Tesis de licenciatura, Escuela Superior Politecnica del Litoral. Guayaquil. Ecuador, pp 121.

Biberstein, E. Chung Zee, Y. 1990. Tratado de Microbiología Veterinaria. Acribia S.A. Zaragoza España, 673p.

Bonne, E. 2001. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry and egg products. In: Microbiology laboratory guidebook. 3^{ra} ed. Food Safety and inspection Service. Department of farming. Washington D.C.

Borie, P. C. S. y. L., 1998. *Salmonella enteritidis*: Un nuevo desafío.. *Tecno Vet*, pp. 1-6.

Calva, E. 2001. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Instituto de Biotecnología, UNAM.

CDC. Center for Disease Control and Prevention of U.S.A. 2007. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food – foodborne diseases active surveillance network. 1996-2012. Morb. Mortal Wkly. Rep. 62: 283 – 287.

CDC. Reports of Selected *Salmonella* Outbreak Investigations. 2013. <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html> (consulta: Junio 2013).

CENAVECE. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. México. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/intd_informacion (Consulta: Junio 2013).

Cervantes, T. L, A. V, A. Chalte y C. K. Tapia. 2008. Enfermedades transmitidas por Alimentos. Capacitación para el Servicio de Alimentación. Secretaria de Educación Pública. http://basica.sep.gob.mx/temposcompleto/pdf/alimentación/ETAs_SEP_2008.pdf (consulta: Junio 2013).

Copes. J., K. Pellicer, G. Echeverria, N.Stanchi, C. Martínez, y L. Leardini. 2000. Investigación de *Listeria monocytogenes* en quesos de pasta blanca. Revista Argentina de Microbiología. 32: 49-52.

EFSA-ECDC. 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. J. EFSA. 9(3): 2090-2101.

Elley. A. 1994 Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. Editorial Acribia.Zaragoza, España. p.17.

Enfermedades., 2008. CDC. [En línea]
Available at: <http://www.cdc.gov/spanish/Datos/BrotesEnfermedades/>
(consulta: Junio 2015).

Estrada. G. T, López, A. B.Zamarripa, M. R. Thompson, C. L. Gutiérrez. M. A. Mancera, y G. A. Escobar. 2004. Prevalence of *Echerichia coli* and *Salmonella* spp. in Street-vended food of open markets (tianguis) and general hygienic an trading practices in Mexico city. J. Epidemiol Infect 132:1181-1184.

FAO/OMS. 2005. Red de vigilancia de enfermedades tranmitidas por los alimentos. Nota de información de INFOSAN No. 6/2005 – WHO Global Salm-Surv.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007. Manual de buenas prácticas para la industria de la carne. Producción y Sanidad animal. FAO. Roma, Italia. 302 p.

FAO/WHO. 2009. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Technical Report, Microbiological Risk Assessment Series No. 12. Roma, Italia. 132 p.

FDA. U.S. Food an Drug Administration. 2001. The problema of foodborne illness. Parnership for food Safety Education. U.S. 35p.

Feld N.C., EKerothL.,Gradel K.O., Kabell S.&Madsen M. , 2000. Evaluaton of a serological Salmonella mix- ELISA for poultry used in a national surveillance programme. En: *Epidemiol. Infect.* s.l.:s.n., pp. 125,263-268.

Flores, A.J, Suarez, H.G, Heredia, N.M, Puc, F.M; Vivas, R.M, 1997. Frecuencia de aislamientos de *Salmonella* spp. En coprocultivos obtenidos en una cohorte de niños asintomáticos. *Rev. Méx. de Ped.*, pp. 254-256.

Fraser A, Goldberg E, Acosta CJ, Paul M, Leibovici L. Vacunas para la Prevención de la Fiebre Tifoidea (Revisión Cochrane traducida). 2008. Biblioteca Cochrane Plus, Número 2. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en:<http://www.update-software.com>.

(Traducida de The Cochrane Library, 2008 Issue 2. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).

Gallegos. R. M. A. L. A. Morales. O. G. Álvarez. G. J. A. Osuna. I. O. Martínez. L. H. Morales-Ramos, y P. Fratamico. 2009. PCR detection and microbiological isolation of *Salmonella* spp. From fresh an cantaloupes. J. Food Sci. 74(1): 37-40.

Gálvez. E. R. 2006. Calidad e inocuidad en las cadenas latinoamericanas de comercialización de alimentos. FAO 14: 1-93.
<http://www.fao.org/Ag/ags/subjects/es/agmarket/agsfop14>. Pdf (Consulta: Agosto 2015)

Glenn J, Karen W, 2005. Microbiology Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. University of Arizona, Tucson.: Elsevier Saunders.

Gonzáles, F.S., T.A. Villagra, M. Pichel. S. Figueroa. G. Meletti, y M.I Caffer. 2009. Caracterización de aislamiento de *Vibrio Cholerae* no-01. no-0139 asociados a cuadros de diarrea. Rev. Argent. Microbiol.41:11-19.

Gurtler. J. B., J. L. Komacki, y L.R.Beuchat. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. International J. Food Microbiology. 104: 21-34.

Gutiérrez. C.L, B.C González, C.S. Giono, y L. G. Beltrán. 2000. Principales serotipos de *Salmonella* identificados en 703 cepas en México entre 1982 y 1993. Rev. Latinoam. Microbiol. 36:221-226.

Gutiérrez. C.S. 2008. Diagnóstico de las enfermedades bacterianas del aparato gastrointestinal. Bacteriología Médica diagnóstica. México. 6:79-81.

Hanna, S. E., C J. Connor, and H. H. Wang, 2005. Hanna, S. E., C J. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. Journal of Food Science 70(3): 49-53., 2005.. *Journal of Food Science*, pp. 49-53.

Hernández. C. C. A. G. Aguilera, y E. G. Castro. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. En. Inf. Microbiol. 31 (4): 137-151.

Jawetz E, J. Melnick, E. Adelberg. 2005. Microbiología Médica. El Manual moderno. 18ª edición. México D.F. pp. 65-73.

León – Ramírez. S. 2002. Shigelosis (disentería bacilar). Salud en Tabasco. Secretaria de Salud del Estado de Tabasco. 8(1): 22-25.

Leyva V., Tamara K., Puig Y., Castro A., Cabrera M., Leyva A, 2008. *Salmonella* un enteropatógeno a seguir teniendo en cuenta. San Jose de Lajas, Cuba.

López. C. 2000. Estado del conocimiento de la Campylobacteriosis en la República Argentina: alcances y limitaciones. Tesis de Maestría en Salud Pública. Centro de Estudios Avanzados. Universidad de Buenos Aires. 112 p.

López. G y P. S. Fernández. 2001. Medidas de concordancia: el índice Kappa, Revista Epidemiologica Clinica y Bioestadistica. 6: 169- 171.

Mahajan. R.K, S.A. Khan, D. S. Chandel, N. Kummar, C.Hans, y R. Chaudhry. 2003. Fatal case of *Salmonella entérica* subsp. *Arizonae* gastroenteritis in an infant with microcephaly. J. Clin Microbiol. 41: 5830-5832.

Manual de operación de Sistemas de Identificación BBL Crystal ID Equipo para la identificación de bacterias grampositivas.

Masena, M. O. 2010. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia Coli* 0157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. <http://www.fags.org/periodicals> (consulta: Mayo 2015).

Mastroeni P., Chabalgoity J.A., Dunstan S.J., Maskell D.J, y Dougan G. 2001. Salmonella: Immune responses and vaccines. Vet. J., 161, 132–164.

Mead G, Steen J, 1999. Tracking trends and analyzing new and reemerging infectious disease around the world. Emerging Infectious Diseases Volumen 5 .

Mercado, F.H. 2007. Implementación del Sistema de Análisis y Puntos Críticos de Control (HACCP) en alimentos. Revista científica UNAL. 5.221-254.

Metodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en agua., 2013. *Revistas.hie*. [En línea] Available at: bus.sld.cu/revistas/hie/vol51_1_13/hie09113.htm (consulta: Abril 2015).

Miranda. L. G. C., M. Villarroel, G. Liste, J. Escós, y G. A. María. 2010. Critical points in the pre-slaughter logistic chain of lambs in Spain that may compromise the animal's welfare. Small Ruminant Research. 90 (3): 174-178.

Murray,P; Baron, E.J; Pfaller, M.a; Tenover, F.C; y Tenover, R.H. 1999. Manual of clinical microbiology. 7th edition. American society for microbiology. Washington, D.C.

Nielsen B., Ekeröth L., Bager F. & Lind P, 1998. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of Salmonella infection in slaughter pig herds. En: *J. Vet. Diagnostic Investigation*. pp. 10, 158-163.

NOM-114-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Método para la Determinación de *Salmonella* en alimentos. 2013. *salud.gob*. [En línea] Available at:

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html> (consulta: Mayo 2015).

(OIE), 2008. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. pp. 6 - 30.

(OMS), Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos.

Painter. J. A, R. . Hoekstra, T. Ayers, R. V. Tause. C. R. Braden, F. J. Angulo, y P. M. Griffin 2013. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data. United States. 1998 - 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 407-415.

Pascual M.R., Calderón V, 2000. Microbiología Alimentaria Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas, 2º edición.

Patrick DL, Burke LB, Powers JH, Scott JA, Rock EP, Dawisha S, O'Neil R, Kennedy DL, 2007. Patient-reported outcomes to support medical product labeling claims: FDA perspective. Seattle.

Pérez C., Sánchez M., Henao S., Cardona N, 2008. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en huevos. Colombia: Universidad CES.

Poppe, C., N. Smart. R. Khakhria. W. Johnson, J. Spika, y J. Prescott. 1998. *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen *J. Can. Vet.* 39 (9): 559-565.

Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica., 2010. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf> (consulta: Mayo 2015).

REFERVET, 2010. Guía Básica de Referencias de Especialidades Veterinarias, Pequeñas y Grandes especies.

Ricon D, Ramírez R, Vargas J, 2011. Transmisión de *Salmonella enterica* través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud* v.43 No.2.

Scallan, E. R. M. Hoekstra. F.j. Angulo, R. V. Tause, M. A. Widdowson, S. L. Roy, J. I. Jones, y P. M. Griffin 2011. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 7- 15.

Sdix, R. C. S., 2010. *Salmonella* Quik System Guide.

Secretara de Salud, C. N. p. l. P. C. R. S. D. G. d. C. S. d. P. y. S., 2001. Manual de manejo higiénico de los alimentos. México, D.F. [En línea] Available at: <http://cofepris.salud.gob.mx/bv/libros.htm> (consulta: Mayo 2015).

Secretara de Salud, S. d. R. y. F. S. D. G. d. C. S. d. B. y. S., 2012. Análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos aplicado al servicio de banquetes. México, D.F. [En línea] Available at: <http://cofepris.salud.gob.mx/bv/libros.htm> (consulta: Mayo 2015).

Secretara de Salud, S. d. R. y. F. S. D. G. d. C. S. d. B. y. S., 2013. Manual de buenas prácticas de higiene y sanidad. México, D.F. 1999. Manual de buenas prácticas de higiene y sanidad. México, D.F. [En línea] Available at: <http://cofepris.salud.gob.mx/bv/libros.htm> (consulta: Mayo 2015).

SIAP. Servicio de información Agroalimentaria y Pesca México. 2013. <http://www.siap.gob.mx> (Consulta: Marzo, 2015).

Smith. J.N., y Ahmer B.M.. 2003. Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. J. Bacteriology. pp.1357-1366.

Stanchi. O. 2007. Microbiología Veterinaria. Primera Edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires, Argentina. 273, Surette. y A. P. White. 2007. Persistence of *Salmonella* on egg conveyor belts is dependent on the belt type not on the rdar morphotype. Poultry Sci. 86:2375-2383.

Steenackers. H, K. Hermans, J. Vanderleyden, y S. C. J. De Keersmaecker. 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence. Structure, regulation and eradication. Food Research International. 45: 502-531.

Stocki, S. L. C. B Annett, C. D. Sibley. M. MacLaws. S. L Checkley, N. Singh, M. G. Surette. 2007. Persistence of *Salmonella* on egg conveyor belts is dependent on the belt type but not on the rdar morphotype. pp 379-456.

Terragno. R, M.L. Caffer. S. Bruno y S. Binstein. 2003. Aislamiento, identificación y serotipificación *Salmonella*. Parte 1. En: Manual de procedimientos Ministerio de Salud de la Secretaría de Políticas. Regulación y Relaciones Sanitarias. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de la Salud “Dr. Carlos C. malbram”. Buenos Aires, Argentina. 253p.

Threlfall E. J. and Fisher I.S. 2005. The enter- net and Salm-gene data bases of foodborne bacterial pathogens that cause human infections in Europe and beyond: an international collaboration in surveillance and the development of intervention strategies. Epidemiol Infect; 133 (1) -7.

Ukuku. D. O., y W. F. fett. 2006. Effects of cell Surface charge an hydrophobicity on attachment of 16 *Salmonella serovars* to cantaloupe rind an decontamination with sanitizers. J. of Food Protection. 69(8): 1835-1843.

Uribe C., Suarez M, 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen animal. *Colombia Medica Vol 37 N°2*.

Van Zijderveld F.G.,Van Bommel A.M.,Anakotta J., 1992. Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens. *J.Clin.Microbiol*, Volumen 30, pp. 2560-2566.

Vidal. J. E, R. A. Canizalez, J.J. Gutiérrez, y G. F. Navarro. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Sal. Pub. Mex. 49: 376-386.

White. A. P. D. L Gibson, G. A. Grassl, W. W. Kay, B. B. Finlay, B. A Vallance, y M. G. Surette. 2008. Aggregation via the red, dry, and round morphotype is not a virulence adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*. 76(3): 1048-1058.

Yang, J. Dong, M.B. Chandrasekharan, T.C. Hall. 2001. Kiddo, a new transposable element family closely associated with rice genes *Mol. Genet. Genomics*, 266 (2001), pp. 417–422